

Univerzita Palackého
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



Experimentální metody studia
obranné reakce rostlin
(KBC/EMORR)

FRVŠ projekt 2473/2012/G4

1. DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM DUSÍKU A KYSLÍKU, NITROSOGLUTATHIONU A NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY

Teoretický úvod

Rostliny, které jsou v průběhu svého života vystaveny působení různých stresových faktorů, vyvinuly účinné obranné mechanismy potřebné pro přežití v jejich přirozeném prostředí. Na přenosu informace o působení stresového faktoru jak biotické tak i abiotické povahy a následném spuštění obranných reakcí se podílí řada signálních molekul. Významnou roli hrají reaktivní formy kyslíku (ROS) a v poslední době intenzivně studovaný oxid dusnatý (NO). Oxid dusnatý a jeho metabolity se označují jako reaktivní formy dusíku (RNS).

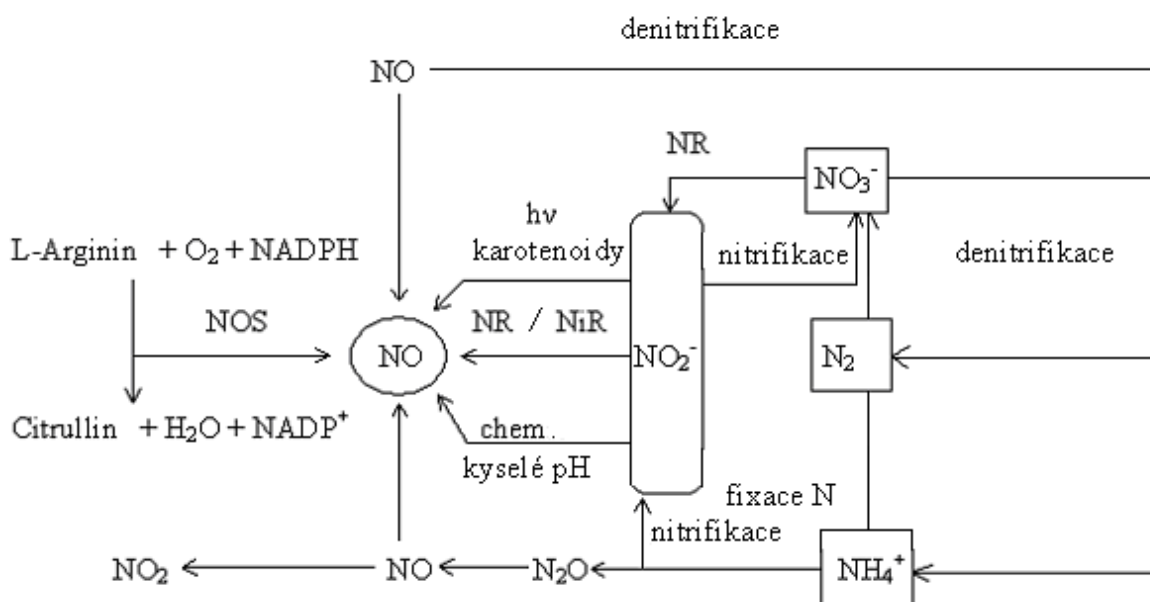
ROS jsou vysoce reaktivní a toxické a mohou vést k oxidativní destrukci buněk. Reaktivní formy kyslíku také hrají významnou roli při ochraně rostlin proti patogenům, účastní se biologických procesů jako je programovaná buněčná smrt, hormonální signalizace, odpověď na stres a vývoj rostliny. Regulovaná tvorba reaktivních forem kyslíku může významně přispívat ke zpevnění buněčné stěny a tím i k větší odolnosti vůči různým stresovým faktorům. Mezi reaktivní formy kyslíku patří singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion-radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), hydroxylový ion (OH^-) a perhydroxylový radikál ($^{\cdot}\text{O}_2\text{H}$). NO je velmi rozšířeným vnitrobuněčným a mezibuněčným poslem se širokým spektrem regulačních funkcí mnoha fyziologických i patologických procesů (Wendehenne et al., 2001, Lamattina et al., 2003, Neill et al., 2003, Del Río et al., 2004). Znalosti funkcí NO v rostlinných systémech jsou ve srovnání s živočišnými systémy velmi malé. Emisi NO u rostlin poprvé zaznamenal Klepper v roce 1975 (Klepper, 1979). Teprve nedávné studie potvrdily úlohu NO jako důležitého efektoru rostlinného růstu, vývoje a rostlinných obranných reakcí. Řada z publikovaných prací byla zaměřena na roli NO v iniciaci nebo propagaci rostlinné hypersenzitivní reakce a programované buněčné smrti v místě infekce (Zaninotto et al., 2006; Mur et al., 2006). Byla prokázána účast NO na indukci exprese komplementární sady rostlinných obranných genů, včetně dvou klíčových enzymů fenylypropanoidní dráhy, která reguluje produkci různých sekundárních sloučenin, včetně ligninu a nízkomolekulárních antimikrobiálních sloučenin známých jako fytoalexiny (Dixon, 2001). Významnou obrannou strategií rostlin vůči biotrofním patogenům je hypersenzitivní reakce (HR), kdy infikovaná buňka nebo několik buněk v blízkém okolí místa infekce podléhají programované buněčné smrti, čímž následně eliminují přímé zdroje energie a výživy pro vstupující biotrofní patogen (Low & Merida, 1996; Greenberg, 1997). Jedním z raných procesů HR je prudká akumulace ROS (Keller et al., 1998) a NO (Durner et al., 1998; Delledonne et al., 1998). Nově byla prokázána rovněž úloha NO v rámci HR. Cytotoxický účinek NO a ROS vyplývá z reakce NO s $\text{O}_2^{\cdot-}$, kdy dochází k tvorbě velmi reaktivního peroxydusitanového aniontu (ONOO^-), který poškozuje lipidy, proteiny a nukleové kyseliny (Lipton et al., 1993; Yamasaki et al., 1999).

NO je vysoce reaktivní molekula, snadno difundující přes buněčné membrány. Je to volný radikál, který může buď získat, nebo ztratit elektron pro vytvoření energeticky výhodnějších struktur, př. nitrosoniový kation (NO^+) a nitroxylový radikál (NO^{\cdot} ; Durner et al., 1998). Poločas života NO v biologických tkáních byl stanoven na méně než 6 s (Thomas et al., 2001). Takto krátký poločas života odráží vysoce reaktivní povahu NO. NO reaguje přímo s kovovými komplexy a dalšími radikály a nepřímo jakožto reaktivní forma dusíku s DNA, proteiny, a lipidy (Wink & Mitchell, 1998). U rostlin byly popsány jak cytotoxické tak cytoprotektivní vlastnosti NO (Beligni & Lamattina, 2001).

V savčích buňkách je NO produkován zejména pětielektronovou oxidací guanidinového dusíku L-argininu enzymy nazývanými NO synthasy (NOS, EC 1.14.13.39). Produkty této reakce jsou L-citrulin a NO. NO synthasy jsou hemoproteiny příbuzné rodině cytochromů P450. Tyto enzymy byly původně charakterizovány jako homodimery,

ale protože je pro enzymovou aktivitu potřebná navíc vazba dvou monomerů kalmodulinu mezi malou a velkou podjednotkou NOS, je funkční holoenzym ve skutečnosti heterotetramer (Knowles & Moncada, 1994). Kromě kalmodulinu je pro katalytický mechanismus NOS nutná současná účast dalších 4 kofaktorů zahrnujících hem, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin. V živočišných buňkách byly popsány tři isoformy NOS: konstitutivní formy endoteliální eNOS a neuronální nNOS a indukovaná forma iNOS. Podle nejnovějších poznatků mohou být formy NOS v různé míře současně exprimovány v jednom typu buněk různých tkání v závislosti na stavu vývoje buňky či vnějších podmínkách (Kavya et al., 2006).

V posledním desetiletí hledalo mnoho rostlinných biologů analogický enzym produkující NO reakčním mechanismem obdobným NO syntasám savčích buněk. Výsledkem je rostoucí počet publikací naznačujících přítomnost NOS aktivity v rostlinách, ale existence tohoto enzymu nebyla doposud přesvědčivě experimentálně prokázána. Proto navzdory znalosti řady procesů kontrolovaných nebo indukovaných vlivem NO u rostlin zůstávají přesné molekulární mechanismy syntézy tohoto radikálu u různých rostlin za různých podmínek stále předmětem intenzivní diskuse. V současnosti bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách (Crawford, 2006). Ke vzniku NO v rostlinách může vést také řada dalších neenzymových reakcí vycházejících z anorganických sloučenin dusíku (Obr. 1).



Obr. 1 Zdroje NO v rostlinách. NO je produkován činností nitrátoreduktasy (NR), nitrit:NO reduktasy (NiNOR) a NO synthasy (NOS). Dalšími generátory NO jsou neenzymové reakce NO₂⁻: redukce za kyselého pH a světlem poháněná redukce v přítomnosti karotenoidů. NO může vznikat také jako vedlejší produkt denitrifikace, nitrátové asimilace, nebo respirace (Wojtaszek, 2000).

Oxid dusnatý je látka s velice krátkou dobou života, která rychle reaguje zejména s reaktivními radikály kyslíku, peroxidy lipidů, thiolovými a hemovými skupinami. Reaktivita NO a jeho metabolitů *in vivo* a *in vitro* značně omezuje přímé metody jejich detekce. Přímé stanovení NO je možno provést chemiluminiscenční metodou po reakci s ozonem v plynné fázi, nebo elektrochemickou detekcí pomocí specifických amperometrických elektrod v roztoku. Obě zmíněné metody jsou však velmi náročné z hlediska ceny použitého přístrojového vybavení, navíc v rostlinném materiálu se vyskytuje celá řada látek, které

s těmito metodami interferují. U živočišných systémů jsou konečnými produkty metabolismu NO v aerobním prostředí dusitany a dusičnany, které lze jednoduše stanovit spektrofotometricky. Naproti tomu je metabolismus dusíkatých látek u rostlin daleko bohatší, což omezuje použití celé řady metod a interpretaci získaných hodnot. Pro stanovení produkce NO lze použít specifické sondy na bázi derivátů diaminonaftalenu, diamino fluoresceinu a diaminorhodaminu, které reagují s reaktivními radikály dusíku vzniklými z NO v aerobním prostředí za vzniku vysoce fluoreskujících derivátů. Tyto sondy neprocházejí přes membrány buněk a jsou proto použitelné pro měření NO v buněčných extraktech nebo v extracelulárním médiu buněčných kultur. Jejich esterové deriváty lze naopak použít pro vnitrobuněčné sledování vznikajícího NO, protože k reakci s metabolity NO a zvýšení fluorescence dochází až po rozštěpení esterové vazby vnitrobuněčnými esterasami. Přes svou jednoduchost mají fluorescenční metody detekce NO určitá omezení v důsledku možných nespecifických reakcí v rostlinném materiálu a proto je nutno všechny metody optimalizovat pro konkrétní rostlinný model.

In vivo jako transportní a zásobní formy nestabilního NO slouží S-nitrosothioly (RSNO), sloučeniny s obecnou strukturou RS-NO. Ve srovnání s NO jsou tyto látky stabilnější, s delším poločasem života. Nejhojněji zastoupený nízkomolekulární S-nitrosothiol představuje S-nitrosoglutathion (GSNO). Klíčovým enzymem katabolismu GSNO je S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), známá také jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH; EC 1.2.1.1). GSNO je upřednostňovaným substrátem GSNOR (Jensen et al., 1998). Ačkoliv je tento enzym vysoce specifický pro GSNO, nepřímo 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.

1.1. PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU

1.1.1. Teoretický úvod

1.1.1.1. 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.

1.1.2. Experimentální vybavení

Chemikálie:

- 4% agarosa
- TBSA-BSAT pH 7,6 (5 M Tris, 0,9% NaCl, 0,05% azid sodný, 0,1% BSA, 0,1% Triton X-100)
- Tris-pufr – 10 mM Tris-HCl pH 7,4

Laboratorní materiál:

filtrační papír, kádinka, květináče, miska s ledem, Pasteurova pipeta, perlit, Petriho misky, pinzeta, plastové kelímky, rašelina, skalpel, štětce, teploměr, vteřinové lepidlo, zahradnický substrát, žiletky

Biologický materiál:

semena *S. lycopersicum* cv. Amateur

Přístroje:

digitální předvážky, fytotron, mikrovlnná trouba, vibratom

1.1.3. Pracovní postup

1.1.3.1. Pěstování rostlin ve skleníku (fytotronu)

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

1.1.3.2. Příprava příčných řezů

- List rajčete (4. patro) položíme na filtrační papír a přitlačením žiletky 3 mm rovnoběžně vedle hlavního cévního svazku provedeme řez. Stejně zopakujeme na druhé straně hlavního cévního svazku. Vypreparovaný cévní svazek žiletkou kolmo rozkrájíme na segmenty po 0,5 cm, koncové segmenty nebudeme dále používat.
- Rostlinu opatrně vytáhneme z květináče a kořeny očistíme od hlíny. Žiletkou připravíme asi 5 mm dlouhé segmenty z části hlavního kořene, ve které je kořen dostatečně silný (těsně pod povrchem zeminy).
- Připravíme si 4% agarosu. Navážku agarosu rozpustíme v destilované vodě opatrným zahříváním v mikrovlnné troubě. Rozpuštěnou agarosu nalejeme do Petriho misky.
- Po zchládnutí agarosu na 40°C pinzetou vložíme kolmo segmenty cévního svazku listu nebo kořene. Během tuhnutí agarosu segmenty pinzetou udržujeme v kolmé pozici, překlápí se. Tuhnutí můžeme urychlit na misce s ledem.
- Po ztuhnutí agarosu skalpelem vyřízneme kvádr 1x1 cm se vzorkem uprostřed. Základnu vteřinovým lepidlem přilepíme na základní kostku vibratomu.
- Na vibratomu připravíme řezy o tloušťce 80 μm . Rychlost řezání a frekvenci vibrací na vibratomu nastavíme podle pokynů vedoucího cvičení. V průběhu řezání vlhčíme žiletku a povrch agarosového kvádru 10 mM Tris-pufrem pomocí štětečku při přípravě řezů pro histochemickou detekci ROS a RNS nebo TBSA-BSAT pH 7,6 pro imunochemickou detekci GSNOR a GSNO.
- Řezy štětečkem opatrně přenášíme do Petriho misky obsahující 10 mM Tris-pufrem pro histochemickou detekci ROS a RNS nebo do Petriho misky obsahující TBSA-BSAT pH 7,6 pro imunochemickou detekci GSNOR a GSNO.

1.2. HISTOCHEMICKÁ DETEKCE REAKTIVNÍCH FOREM DUSÍKU A KYSLÍKU

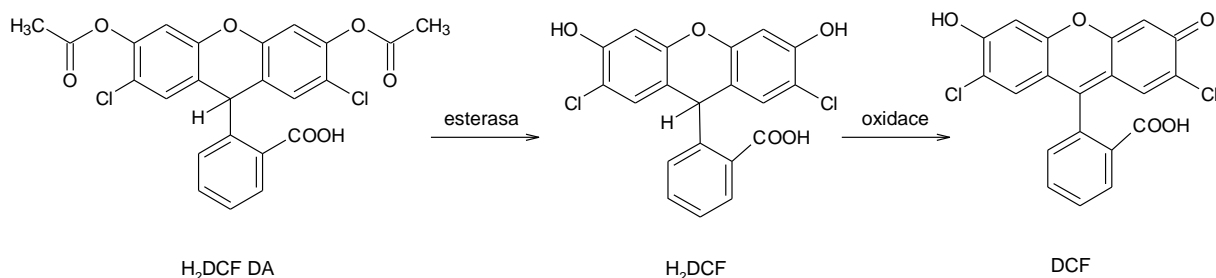
1.2.1. Teoretický úvod

Histochemické metody slouží ke studiu složení tkání a buněk. Mikroskopickou analýzou ve světelném i elektronovém mikroskopu se ve vzorcích prokazuje přítomnost určitých látek nebo enzymová aktivita.

Detekce peroxidu vodíku (H_2O_2)

Peroxid vodíku, který vzniká dvouelektronovou redukcí kyslíku, se řadí mezi ROS, ačkoliv není volným radikálem. Je považován za jednu ze stabilnějších forem ROS, v nepřítomnosti přechodných kovů je velmi stabilní a nereaktivní. V rostlinných buňkách je produkován v mitochondriích, chloroplastech, peroxisomech, cytoplasmě, cytoplasmatické membráně a buněčné stěně. Peroxid vodíku je v závislosti na koncentraci zapojen v řadě fyziologických i patofyziologických procesů. Vysoké koncentrace H_2O_2 vedou ke vzniku oxidačního stresu, v nízkých koncentracích působí jako signální molekula. Je zapojen v mnoha procesech, např. růst a vývoj rostlin, fotosyntéza, fotorespirace, zavírání průduchů, senescence, odpověď na stresové faktory a další.

Pro detekci H_2O_2 se často používá fluorescenční sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H_2DCF DA). Tato sonda není dostatečně selektivní, ačkoliv se původně předpokládalo, že reaguje pouze s H_2O_2 , ukázalo se, že reaguje s dalšími druhy ROS i s některými druhy RNS. H_2DCF DA prochází přes buněčné membrány, po vstupu do buňky je buněčnými esterasami deacetylován na 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF), který reaguje s H_2O_2 za vzniku vysoce fluorescenčního produktu (Obr. 2). Fluorescenční signály pozorujeme při excitační/emisní vlnové délce 498/522 nm (Kojima et al., 1999). Jako negativní kontrola se používá askorbát sodný, který se účastní odstraňování ROS. Velmi rychle reaguje se singletovým kyslíkem, peroxidem vodíku a superoxidem.



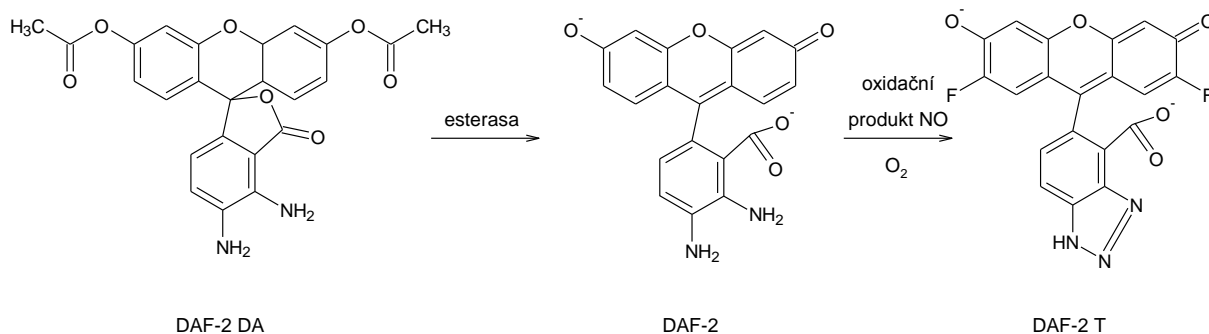
Obr. 2 Reakce fluorescenční sondy H_2DCF DA. Sloučenina je esterasou deacetylována po vstupu do buňky.

Detekce oxidu dusnatého (NO)

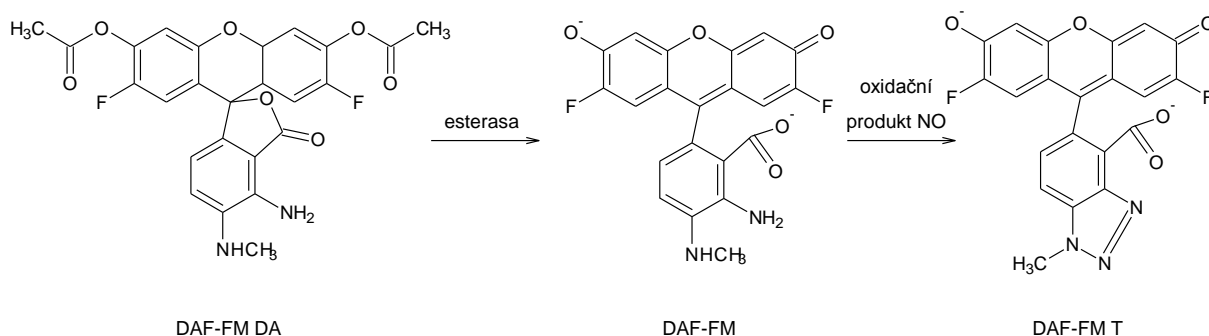
Účast oxidu dusnatého v mnoha vývojových procesech byla popsána u rostlin stejně jako u živočichů a dalších organismů. NO se jako signální molekula podílí na kontrole a regulaci procesů prakticky ve všech vývojových stádiích rostlin. Je klíčovou molekulou i mnoha různých intracelulárních procesů.

Používání fluorescenčních sond pro detekci NO je velmi rozšířené díky tomu, že sondy jsou citlivé a jejich použití je jednoduché. Nejrozšířenějšími indikátory jsou 4,5-diaminofluorescein diacetát (DAF-2 DA) a 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA). Obě sondy prochází membránami a po vstupu do buňky jsou vnitrobuněčnými esterasami deacetylovány. Vznikající 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) a 4-

amino-5-methylamino-2',7'difluorofluorescein (DAF-FM) samy o sobě nefluoreskují, ale reagují s oxidačními produkty NO za vzniku vysoce fluorescenčních triazofluoresceinů (DAF-x T; Obr. 3, 4), které jsou zachyceny v cytoplasmě. DAF-FM je ve srovnání s DAF-2 fotostabilnější a citlivější, se stabilní a silnou fluorescencí v širokém rozmezí pH (Kojima et al., 1999; Itoh et al., 2000). Fluorescenční signály pozorujeme při excitační/emisní vlnové délce 495/515 nm.

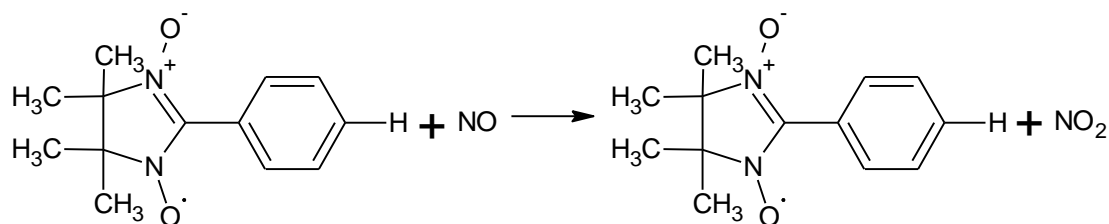


Obr. 3 Reakce fluorescenční sondy DAF-2 DA. Sloučenina je esterasa deacetylována po vstupu do buňky.

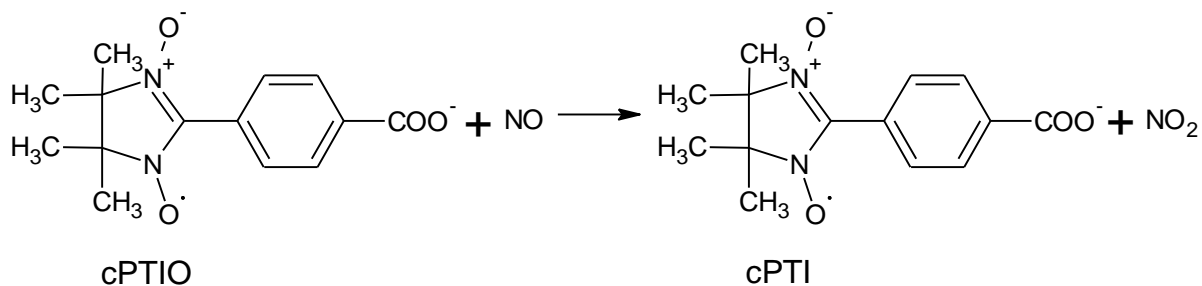


Obr. 4 Reakce fluorescenční sondy DAF-FM DA. Sloučenina je esterasa deacetylována po vstupu do buňky.

Pro ověření, že sledovaný signál detekuje molekulu oxidu dusnatého, se jako negativní kontrola používá detekce v prostředí s lapači NO. Jako lapač NO se používá 2-phenyl-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO) a jeho deriváty, např. 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5,-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (carboxy-PTIO, c-PTIO). PTIO a cPTIO reagují s NO za vzniku iminonitroxidů a NO₂ (Obr. 5, 6). Stechiometrický poměr NO:cPTIO se pohybuje v rozmezí 1 až 2, závisí na hladině NO. Při nízkých hladinách NO se blíží 1, při vysokých hladinách NO se blíží 2 (Hogg et al., 1995). Kvantifikace NO v metodách, které jsou založené na sledování tvorby iminonitroxidů, je možná pouze při nízkých hladinách NO (Goldstein et al., 2003). Lapače NO jsou vysoce specifické.



Obr. 5 Reakce PTIO a NO.

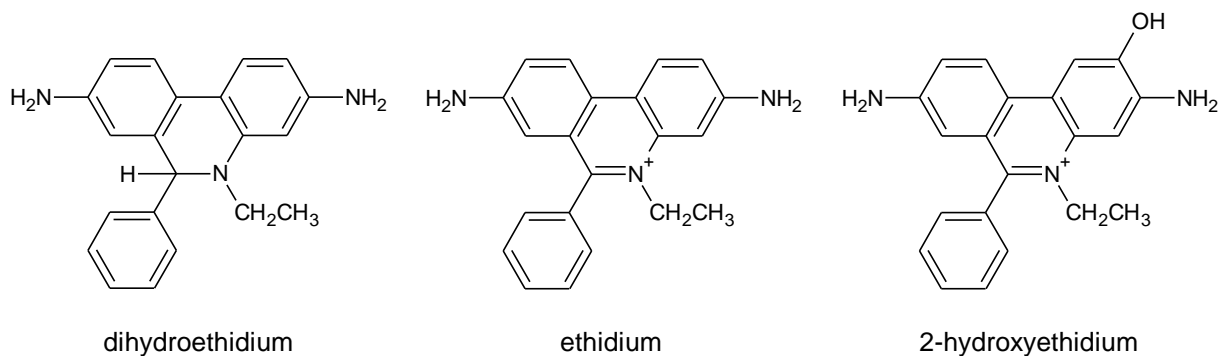


Obr. 6 Reakce cPTIO a NO.

Detekce superoxidu ($O_2^{\cdot-}$)

Reaktivní formy kyslíku jsou v rostlinných buňkách důležité signální molekuly; jsou zahrnuty v řadě fyziologických procesů, jako je např. programovaná buněčná smrt, vývoj rostlin, hormonální signalizace. Předpokládá se i zapojení superoxidu v buněčném dělení, růstu a diferenciaci (Kranner et al., 2010). Superoxid je produkován NADPH oxidasou, jako vedlejší produkt mitochondriální respirace komplexu I a III a několika dalšími enzymy, např. xanthinoxidasou. Díky vysokému oxidačnímu potenciálu může způsobit i oxidativní poškození buněk.

Jednou z nejčastěji používaných fluorescenčních sond pro detekci superoxidu je dihydroethidium (hydroethidin, DHE; Obr. 7). DHE je pravděpodobně nejvíce specifická a nejméně problematická sonda, snadno prochází buněčnou membránou a v buňce je dobře zadržován. Dlouho se předpokládalo, že reakcí DHE a superoxidu vzniká ethidium (E^+ ; Obr. 7), červený fluorescenční produkt, který se vmezeřuje do DNA. Později bylo prokázáno (Zhao et al., 2003), že reakcí DHE a superoxidu vzniká 2-hydroxyethidium ($2-OH-E^+$; Obr. 7; Zhao et al., 2005), fluorescenční produkt odlišný od E^+ . $2-OH-E^+$ se netvoří reakcí DHE s žádnou z dalších reaktivních forem kyslíku a dusíku.

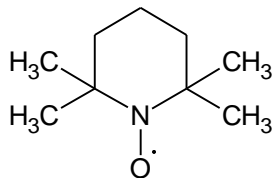


Obr. 7 Dihydroethidium, ethidium, 2-hydroxyethidium.

E^+ a $2-OH-E^+$ se váží na DNA a dochází ke zvýšení intenzity fluorescenčního signálu. Fluorescenční spektra E^+ , $2-OH-E^+$ a komplexů E^+/DNA , $2-OH-E^+/DNA$ se překrývají. Aby bylo možné rozlišit příspěvky jednotlivých složek k celkovému fluorescenčnímu signálu, je potřeba zvolit vhodné excitační/emisní filtry. Optimální excitační/emisní vlnová délka pro detekci fluorescenčního signálu $2-OH-E^+$ je 490/560-570 nm (Zhao et al., 2005). Za těchto podmínek je příspěvek E^+ minimální. Superoxid byl po reakci s DHE detekován také jako zelený fluorescenční signál při použití excitační/emisní vlnové délky 488/520 nm (Valderrama et al., 2007).

In vivo je jedním z antioxidačních enzymů superoxidodismutasa. Zháší molekuly superoxidu převedením dvou molekul $O_2^{\cdot-}$ na kyslík a peroxid vodíku. Při detekci superoxidu

v připravených řezech lze jako negativní kontrolu použít např. šestiuhlíkaté sloučeniny piperidin-1-oxylu, které se superoxidem rychle reagují (Samuni et al., 1990). Takovými sloučeninami jsou například 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO; Obr. 8), 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPOL) nebo 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPAMIN).

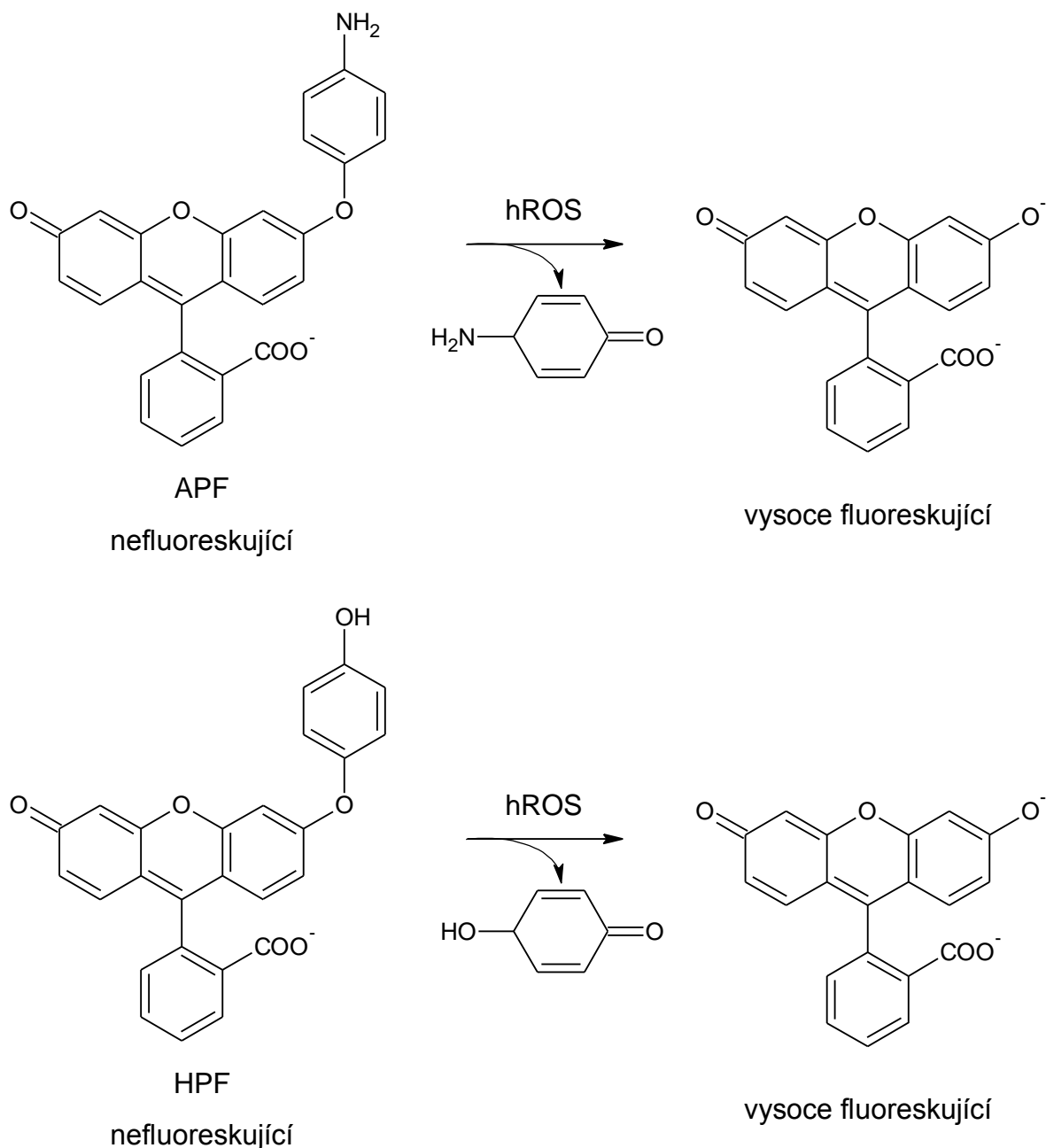


Obr. 8 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO).

Detekce peroxydusitanu (ONOO⁻)

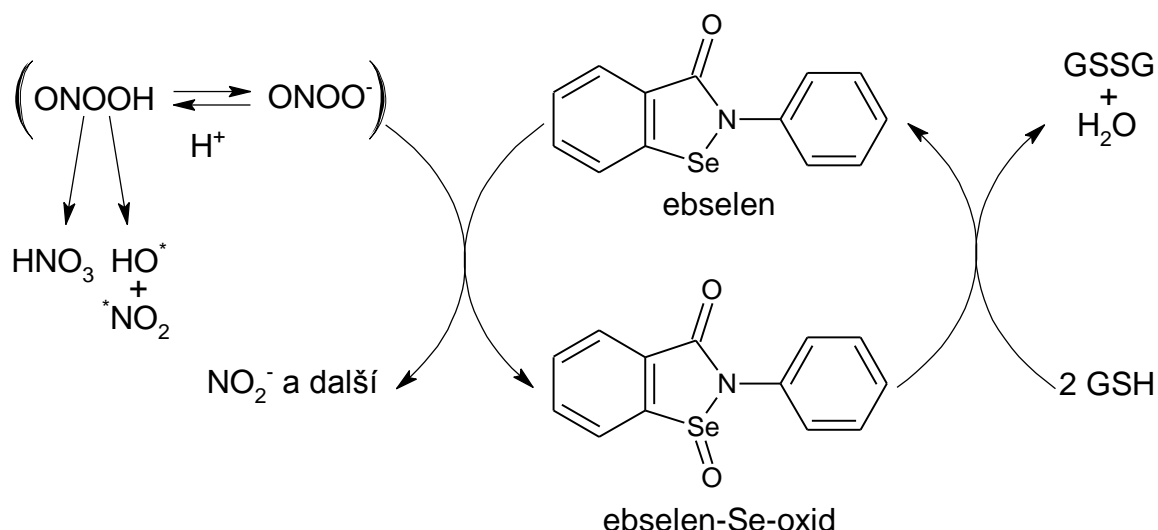
Peroxydusitan je silné oxidační činidlo. Může vznikat v biologických systémech a byla popsána řada destruktivních reakcí s makromolekulami – DNA, lipidy, proteiny. Při reakci peroxydusitanu s proteiny typicky dochází k oxidaci thiolových skupin a methioninu nebo k nitraci tyrosinu.

Pro selektivní detekci vysoce reaktivních forem kyslíku (hROS), mezi které se řadí peroxydusitan (ONOO⁻), hydroxylový radikál ([•]OH) a hypochlorid (⁻OCl), byly vyvinuty fluorescenční sondy 3'-(*p*-aminofenyl)fluorescein (APF) a 3'-(*p*-hydroxyfenyl)fluorescein (HPF; Setsukinai et al., 2003). Tyto látky samy o sobě nefluoreskují; vysoce fluorescenční sloučeniny vznikají po reakci s některou z hROS (Obr. 9), ne však s dalšími ROS. Tyto sondy tak umožňují rozlišit hROS od H₂O₂, NO a O₂⁻. Současné použití APF i HPF zároveň umožňuje detekovat ⁻OCl, který reaguje s APF, ale neposkytuje fluorescenční signál s HPF (Setsukinai et al., 2003). Detekční limit metod s APF je 50 nM (Cohn et al., 2009). Excitační/emisní vlnová délka pro pozorování fluorescenčního signálu APF a HPF je 490/515 nm.



Obr. 9 Reakce nefluoreskujících molekul APF a HPF s hROS za vzniku vysoce fluorescenčních sloučenin.

Jako negativní kontrola pro detekci peroxydusitanu se používají vzorky inkubované v prostředí ebselenu (Obr. 10); systematický název je 2-fenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on. V alkalickém pH ebselen reaguje s peroxydusitanem rychle a kvantitativně za tvorby ebselen-Se-oxidu. Za fyziologických hodnot pH je peroxydusitan protonován na kyselinu peroxydusitou, která se rychle rozkládá. Reakce ebselenu s peroxydusitanem je při fyziologickém pH téměř kvantitativní. I v kyselém pH, kde převažuje kyselina peroxydusitá, ebselen reaguje s peroxydusitanem velice rychle a ebselen-Se-oxid je hlavním produktem reakce. Ebselen-Se-oxid je snadno převeden zpět na ebselen redukčními činidly, např. glutathionem (Masumoto et al., 1996).

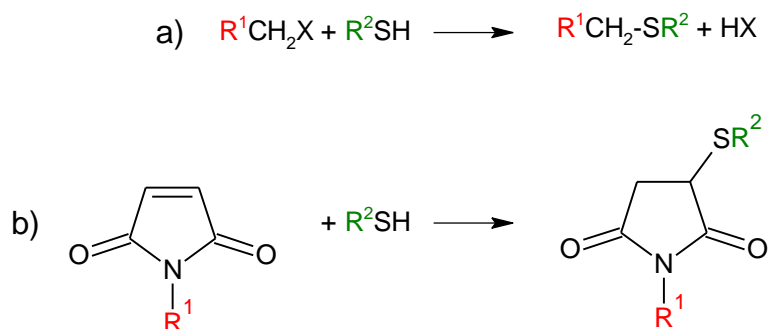


Obr. 10 Oxidace ebselenu peroxydisitanem za vzniku ebselen-Se-oxidu (levá část obrázku). Redukce ebselen-Se-oxidu na ebselen glutathionem (pravá část obrázku; upraveno podle Masumoto et al., 1996).

Detekce nitrosothiolů (RSNO)

S-Nitrosothioly vznikají buď reakcí donoru nitrosylu (NO^+) s volným thiolem, nebo transnitrosylační reakcí mezi S-nitrosothiolem a aminokyselinou, peptidem či proteinem s volnou thiolovou skupinou (Akhter et al., 2003). Ve srovnání s NO jsou to stabilnější látky s delším poločasem života, *in vivo* slouží především jako zásobní a transportní formy NO. Byly detekovány v intracelulárních i extracelulárních prostorech.

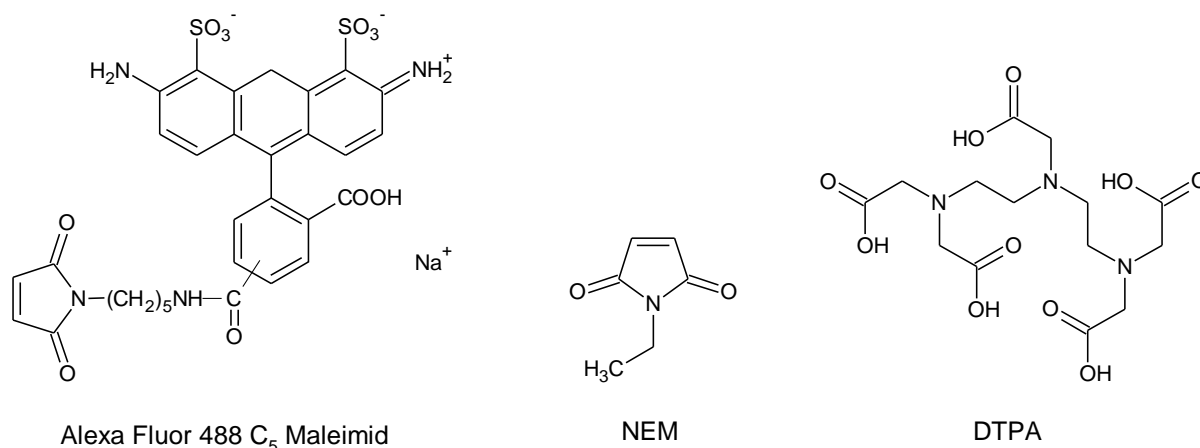
Thiolové skupiny jsou v proteinech přítomné v cysteinových residuích; cystein je hlavním cílem sondy pro značení thiolových skupin. Thiolové skupiny mohou být vytvořeny také redukcí cystinu, disulfidu cysteinu, dithiothreiolem nebo β -mercaptoethanolem. Pro značení thiolových skupin je možné využít řady sond, např. jodacetamidy, maleimidy, bromomethylketony a další. Při reakci dochází k S-alkylaci thiolů za vzniku thioetherů (Obr. 11). Maleimidy jsou pro detekci RSNO ve srovnání s jodacetamidy selektivnější, protože nereagují s histidinem, methioninem ani tyrosinem. Optimální pH pro reakci maleimidů je pH blízké hodnotám 7.



Obr. 11 a) Reakce alkylhalogenidu nebo halogenacetamidu s thiolem za vzniku thioetheru a halogenvodíku ($\text{X} = \text{I}, \text{Br}, \text{Cl}$); b) Reakce maleimidu s thiolem za vzniku thioetheru.

Označení S-nitrosothiolů fluorescenční sondou Alexa Fluor® 488 C₅ Maleimid (Af-M; Obr. 12) probíhá v několika krocích. V prvním kroku je vzorek inkubován s N-ethylmaleimidem (NEM; Obr.12) a diethylentriaminpentaoctovou kyselinou (DTPA; Obr.

12). NEM reaguje s volnými thiolovými skupinami; DTPA je chelatační sloučenina, která brání destabilizaci RSNO. Vazba –NO skupiny na thiolovou skupinu cysteinu, S–NO, je následně zredukována β-mercaptoethanolem; volné thiolové skupiny, které se vytvoří v tomto kroku, jsou následně označeny fluorescenční sondou Af-M. Fluorescenční signál pozorujeme při excitační/emisní vlnové délce 495/519 nm.



Obr. 12 Alexa Fluor® 488 C₅ Maleimid, N-ethylmaleimid (NEM), diethylentriaminpentaocetová kyselina (DTPA).

Autofluorescence

Problémy při pozorování fluorescenčních značek může způsobovat autofluorescence vzorků; autofluorescence je přirozená emise světla. Emisní spektrum autofluoreskujících molekul je velice široké a může být obtížné odlišit autofluorescenční signál od signálu použité fluorescenční značky. V rostlinných vzorcích jsou autofluoreskujícími molekulami např. NAD(P)H, chlorofyl, riboflavin, polyfenoly a další. Při pořizování fotodokumentace pozorovaných objektů je možné autofluorescenční signál odstranit nastavením kratší doby expozice. Tento postup může být problematický, pokud je pozorovaný fluorescenční signál příliš slabý. Nastavením příliš krátké doby expozice může být potlačen.

1.2.2. Experimentální vybavení

Chemikálie:

- 5 mM Alexa Fluor® 488 C₅ Maleimid (Af-M) v DMSO
- 5 mM 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) v DMSO
- 5 mM 3'-(p-aminofenyl)fluorescein (APF) v DMSO
- 20 mM askorbát sodný v H₂O (připravujeme vždy čerstvý)
- 250 mM 2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid (cPTIO) v DMSO
- 10 mM diethylentriaminpentaocetová kyselina (DTPA) v 1 M HCl
- 10 mM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF DA) v DMSO
- 5 mM dihydroethidium (DHE) v DMSO
- 25 mM ebselen v DMSO
- 1 M N-ethylmaleimid (NEM) v ethanolu
- β-mercaptoethanol
- 20 mM 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) v DMSO
- Tris-pufr – 10 mM Tris-HCl pH 7,4

Laboratorní materiál:

12-jamková mikrotitrační destička, alobal, automatické pipety, bezbarvý lak, košíčky se sítkem, krycí, sklíčko, mikrozkuhavky, Petriho miska, pinzeta, podložní sklíčka, špičky na pipety, štětečky

Biologický materiál:

řezy připravené podle návodu v kapitole 1.1. Příprava rostlinného materiálu

Přístroje:

fluorescenční mikroskop, inkubátor

1.2.3. Pracovní postup

- Pro detekci určité reaktivní formy dusíku nebo kyslíku si ze zásobních roztoků připravíme do mikrozkuhovek roztoky pracovní podle tabulek uvedených v následujících kapitolách (1.2.3.1-5). Pracujeme při co nejmenším osvětlení a zásobní i připravené pracovní roztoky uchováváme ve tmě (mikrozkuhavky zabalíme do alobalu).
- Roztoky, ve kterých budeme inkubovat připravené řezy, připravíme z pracovních roztoků do mikrozkuhovek podle tabulek uvedených v následujících kapitolách (1.2.3.1-5). Pracujeme při co nejmenším osvětlení a připravené roztoky uchováváme ve tmě (mikrozkuhavky zabalíme do alobalu).
- Při detekci každé z forem ROS nebo RNS kromě vzorku připravíme ještě negativní kontrolu s lapačem detekované látky a nebarvenou negativní kontrolu. Nebarvenou negativní kontrolu představují řezy, které celou dobu uchováváme v Tris-pufu.
- Řezy budeme inkubovat v košíčkách v jamkách mikrotitrační destičky; jednotlivé roztoky, jejich objemy a doby inkubace jsou uvedené v tabulkách (Tab. 3, 6, 9, 12 a 14) v následujících kapitolách. Roztoky do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme vždy až po uplynutí doby inkubace předchozího kroku. Všechny inkubace provádíme ve tmě; destičku zavřeme víčkem a zabalíme do alobalu.
- Při inkubaci řezů vzorku a řezů negativní kontroly napipetujeme první roztok do jamky mikrotitrační destičky. Do jamky s roztokem umístíme košíček se sítkem a do košíčku štětečkem opatrně přeneseme 7 řezů z Petriho misky s Tris-pufem.
- Po uplynutí příslušné doby inkubace košíček s řezy přeneseme do jamky s dalším roztokem. Košíček z jamky vytáhneme pinzetou, velice opatrně oklepeme kapičky roztoku, které na něm zůstaly, a přeneseme ho do další jamky.
- Po posledním promývacím kroku řezy štětečkem opatrně přeneseme z košíčků na podložní sklíčka s 50 μ l 10 mM Tris-pufu. Na řezy položíme krycí sklíčko a jeho kraje přetřeme bezbarvým lakem. Připravená sklíčka uložíme do tmy a postupně vyhodnotíme.
- Pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujeme příslušné fluorescenční signály. Používané hranoly jsou uvedeny u jednotlivých kapitol (1.2.3.1-5). Porovnáme signály nebarvené negativní kontroly (možná autofluorescence), negativní kontroly s lapačem a barveného vzorku.
- Pomocí digitální kamery nainstalované na mikroskopu zhotovíme snímky, které budou sloužit jako dokumentace výsledků. Každý řez vyfotíme nejprve s použitím hranolu pro fluorescenci a následně ve viditelném světle.

1.2.3.1. Detekce peroxidu vodíku

- Ze zásobních roztoků připravíme pracovní roztoky podle následující tabulky (Tab. 1).

Tabulka 1: Příprava pracovních roztoků.

	objem zásobního roztoku	
	10 mM H ₂ DCF DA	Tris-pufr
20 μM H ₂ DCF DA	4 μl	1996 μl

- Z pracovních roztoků podle následující tabulky (Tab. 2) připravíme roztoky, ve kterých budeme inkubovat řezy.

Tabulka 2: Příprava roztoků pro inkubaci řezů.

	objem pracovního roztoku		
	20 mM askorbát sodný	20 μM H ₂ DCF DA	Tris-pufr
10 mM askorbát sodný	1000 μl	-	1000 μl
10 mM askorbát sodný + 10 μM H ₂ DCF DA	1000 μl	1000 μl	-
10 μM H ₂ DCF DA	-	1000 μl	1000 μl

- Inkubaci řezů v košíčku v jamkách mikrotitrační destičky provedeme podle rozpisu uvedeného v následující tabulce (Tab. 3).

Tabulka 3: Inkubace řezů pro detekci H₂O₂.

jamka	vzorek	negativní kontrola
1	Tris-pufr 3 ml, 20 min	10 mM askorbát sodný 20 min
2	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
3	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
4	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
5	10 μM H ₂ DCF DA 2 ml, 10 min	10 mM askorbát sodný + 10 μM H ₂ DCF DA 2 ml, 10 min
6	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
7	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
8	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min

- Pro pozorování fluorescenčního signálu použijeme hranol U-MWB2.

1.2.3.2. Detekce oxidu dusnatého

- Ze zásobních roztoků připravíme pracovní roztoky podle následující tabulky (Tab. 4).

Tabulka 4: Příprava pracovních roztoků.

	objem zásobního roztoku		
	250 mM cPTIO	5 mM DAF-FM DA	Tris-pufr
400 μ M cPTIO	3,2 μ l	-	1997 μ l
20 μ M DAF-FM DA	-	8 μ l	1992 μ l

- Z pracovních roztoků podle následující tabulky (Tab. 5) připravíme roztoky, ve kterých budeme inkubovat řezů.

Tabulka 5: Příprava roztoků pro inkubaci řezů.

	objem pracovního roztoku		
	400 μ M cPTIO	20 μ M DAF-FM DA	Tris-pufr
200 μ M cPTIO	1000 μ l	-	1000 μ l
200 μ M cPTIO + 10 μ M DAF-FM DA	1000 μ l	1000 μ l	-
10 μ M DAF-FM DA	-	1000 μ l	1000 μ l

- Inkubaci řezů v košíčku v jamkách mikrotitrační destičky provedeme podle rozpisu uvedeného v následující tabulce (Tab. 6).

Tabulka 6: Inkubace řezů pro detekci NO.

jamka	vzorek	negativní kontrola
1	Tris-pufr 3 ml, 20 min	200 μ M cPTIO 20 min
2	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
3	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
4	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
5	10 μ M DAF-FM DA 2 ml, 10 min	200 μ M cPTIO + 10 μ M DAF-FM DA 2 ml, 10 min
6	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
7	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
8	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min

- Pro pozorování fluorescenčního signálu použijeme hranol U-MWB2.

1.2.3.3. Detekce superoxidu

- Ze zásobních roztoků připravíme pracovní roztoky podle následující tabulky (Tab. 7).

Tabulka 7: Příprava pracovních roztoků.

	objem zásobního roztoku		
	20 mM TEMPO	5 mM DHE	Tris-pufr
2 mM TEMPO	200 μ l	-	1800 μ l
20 μ M DHE	-	8 μ l	1992 μ l

- Z pracovních roztoků podle následující tabulky (Tab. 8) připravíme roztoky, ve kterých budeme inkubovat řezy.

Tabulka 8: Příprava roztoků pro inkubaci řezů.

	objem pracovního roztoku		
	2 mM TEMPO	20 μ M DHE	Tris-pufr
1 mM TEMPO	1000 μ l	-	1000 μ l
1 mM TEMPO + 10 μ M DHE	1000 μ l	1000 μ l	-
10 μ M DHE	-	1000 μ l	1000 μ l

- Inkubaci řezů v košíčku v jamkách mikrotitrační destičky provedeme podle rozpisu uvedeného v následující tabulce (Tab. 9).

Tabulka 9: Inkubace řezů pro detekci superoxidu.

jamka	vzorek	negativní kontrola
1	Tris-pufr 3 ml, 20 min	1 mM TEMPO 2ml, 20 min
2	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
3	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
4	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
5	10 μ M DHE 2 ml, 37°C, 10 min	1 mM TEMPO + 10 μ M DHE 2 ml, 37°C, 10 min
6	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
7	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
8	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min

- Pro pozorování fluorescenčního signálu použijeme hranol U-MWB2.

1.2.3.4. Detekce peroxydusitanu

- Ze zásobních roztoků připravíme pracovní roztoky podle následující tabulky (Tab. 10).

Tabulka 10: Příprava pracovních roztoků.

	objem zásobního roztoku		
	25 mM ebselen	5 mM APF	Tris-pufr
40 μ M ebselen	3,2	-	1997 μ l
20 μ M APF	-	8 μ l	1992 μ l

- Z pracovních roztoků podle následující tabulky (Tab. 11) připravíme roztoky, ve kterých budeme inkubovat řezy.

Tabulka 11: Příprava roztoků pro inkubaci řezů.

	objem pracovního roztoku		
	40 μ M ebselen	20 μ M APF	Tris-pufr
20 μ M ebselen	1000 μ l	-	1000 μ l
20 μ M ebselen + 10 μ M APF	1000 μ l	1000 μ l	-
10 μ M APF	-	1000 μ l	1000 μ l

- Inkubaci řezů v košíčku v jamkách mikrotitrační destičky provedeme podle rozpisu uvedeného v následující tabulce (Tab. 12).

Tabulka 12: Inkubace řezů pro detekci peroxydusitanu.

jamka	vzorek	negativní kontrola
1	Tris-pufr 3 ml, 20 min	20 μ M ebselen 20 min
2	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
3	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
4	-	Tris-pufr 3 ml, 2 min
5	10 μ M APF 2 ml, 10 min	20 μ M ebselen + 10 μ M APF 2 ml, 10 min
6	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
7	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
8	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min

- Pro pozorování fluorescenčního signálu použijeme hranol U-MWB2.

1.2.3.5. Detekce nitrosothiolů

- Ze zásobních roztoků podle následující tabulky (Tab. 13) připravíme roztoky, ve kterých budeme inkubovat řezů.

Tabulka 13: Příprava roztoků pro inkubaci řezů.

	objem zásobního roztoku				
	1 M NEM	10 mM DTPA	Tris- pufr	β- mercaptoethanol	5 mM Af-M
10 mM NEM + 100 μM DTPA	20 μl	20 μl	1960 μl	-	-
β-mercaptoethanol	-	-	1999 μl	1,4 μl	-
10 μM Af-M	-	-	1996 μl	-	4 μl

- Inkubaci řezů v košíčku v jamkách mikrotitrační destičky provedeme podle rozpisu uvedeného v následující tabulce (Tab. 14).

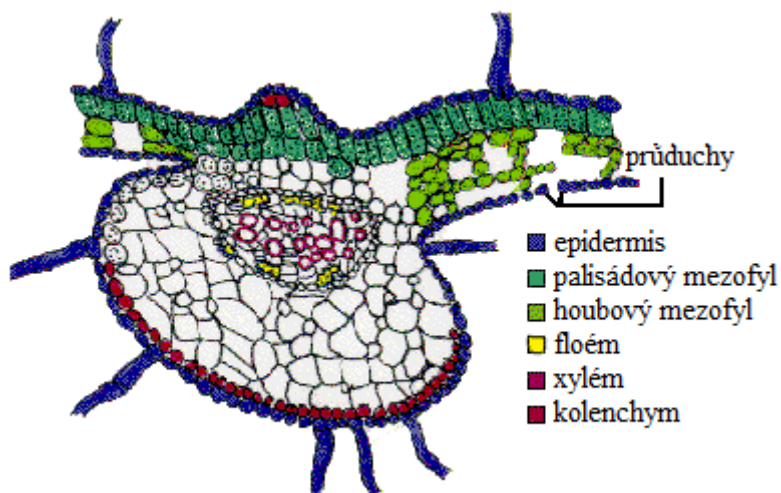
Tabulka 14: Inkubace řezů pro detekci nitrosothiolů.

jamka	vzorek	negativní kontrola
1	10 mM NEM + 100 μM DTPA 10 min	10 mM NEM + 100 μM DTPA 10 min
2	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
3	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
4	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
5	β-mercaptoethanol 2 ml, 10 min	β-mercaptoethanol 2 ml, 10 min
6	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
7	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
8	Tris-pufr 3 ml, 2 min	Tris-pufr 3 ml, 2 min
9	10 μM Af-M 2 ml, 10 min	-
10	Tris-pufr 3 ml, 2 min	-
11	Tris-pufr 3 ml, 2 min	-
12	Tris-pufr 3 ml, 2 min	-

- Pro pozorování fluorescenčního signálu použijeme hranol U-MWB2.

1.2.4. Vyhodnocení výsledků

- Pořídíme fotodokumentaci rostlinných řezů ve viditelném světle a s použitím fluorescenčního hranolu.
- Na fotce řezu ve viditelném světle popíšeme anatomii podle Obr. 13.
- Na fotkách, které dokumentují fluorescenční signály, popíšeme, v kterých částech listu se sledované reaktivní formy dusíku a kyslíku vyskytují.

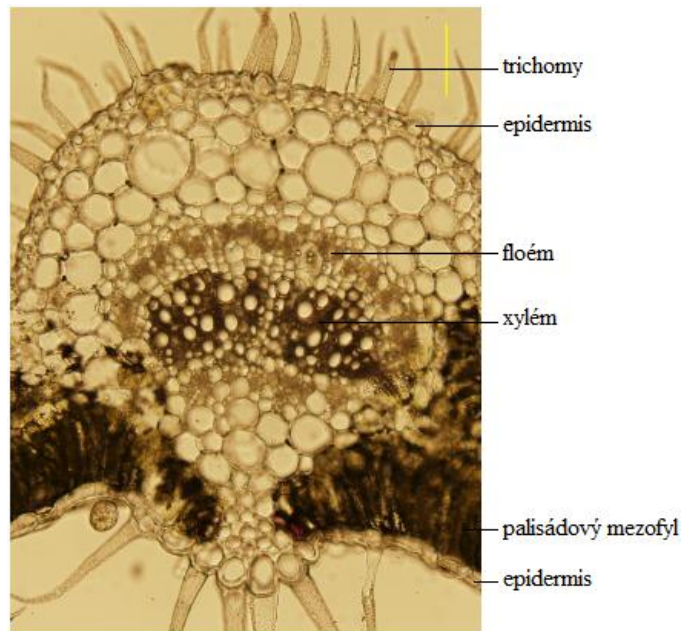


Obr. 13 Anatomie příčného řezu hlavního cévního svazku listu *Solanum lycopersicum*.

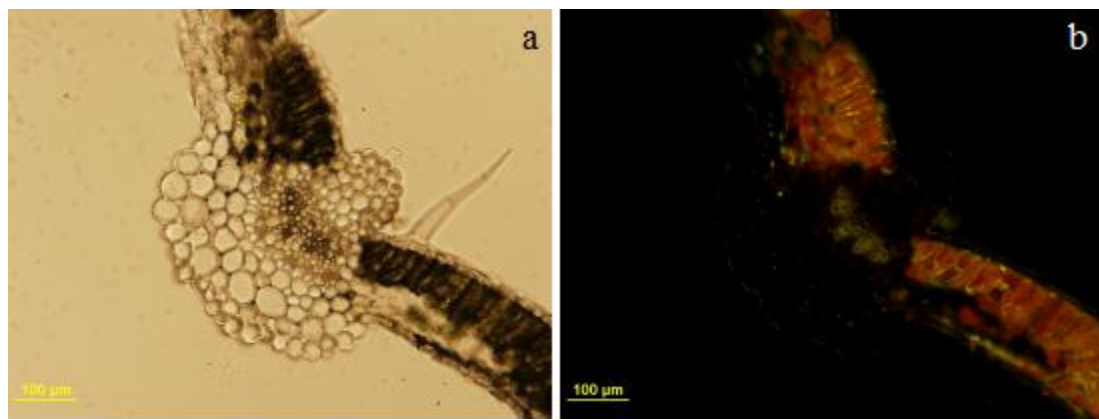
1.2.5. Příklady výsledků a možné problémy

Pořízené fotografie zpracujeme a popíšeme. Do protokolu vybereme jednu fotku řezu listu ve viditelném světle a popíšeme anatomii řezu (Obr. 14). Dále uvedeme fotografie řezů s detekovanými reaktivními formami dusíku a kyslíku (Obr. 15-17) a popíšeme, kde jsme RNS a ROS detekovali.

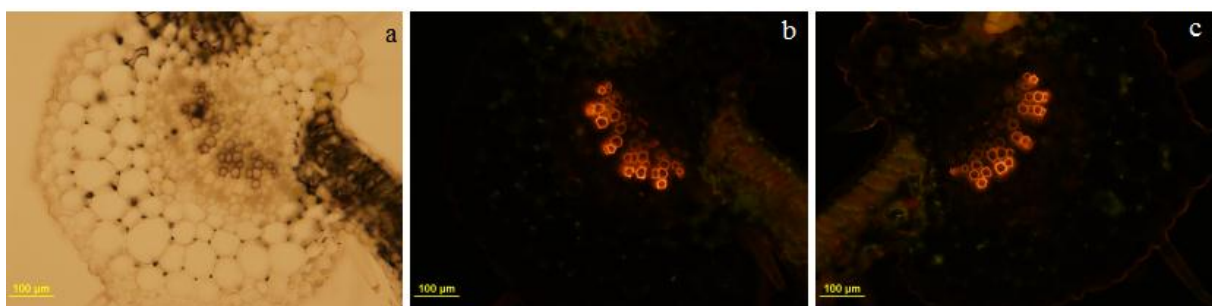
V uvedených příkladech byl detekován $O_2^{\cdot-}$ a $ONOO^-$. U všech vzorků byla pozorována autofluorescence (Obr. 15), která byla nejsilnější v palisádovém mezofylu, pravděpodobně díky chlorofylu. Superoxid ani peroxydusitan detekovány nebyly. U vzorků barvených pro detekci $O_2^{\cdot-}$ byl v xylému pozorován červený fluorescenční signál (Obr. 16), který ovšem superoxidu nepatří. U vzorků barvených pro detekci $ONOO^-$ (Obr. 17) nebyl pozorován fluorescenční signál u negativní kontroly ani vzorku. Je možné, že $O_2^{\cdot-}$ ani $ONOO^-$ nebyly v rostlinách přítomny v dostatečném množství pro vizualizaci použitými fluorescenčními sondami. Rostliny nebyly vystaveny žádnému stresu.



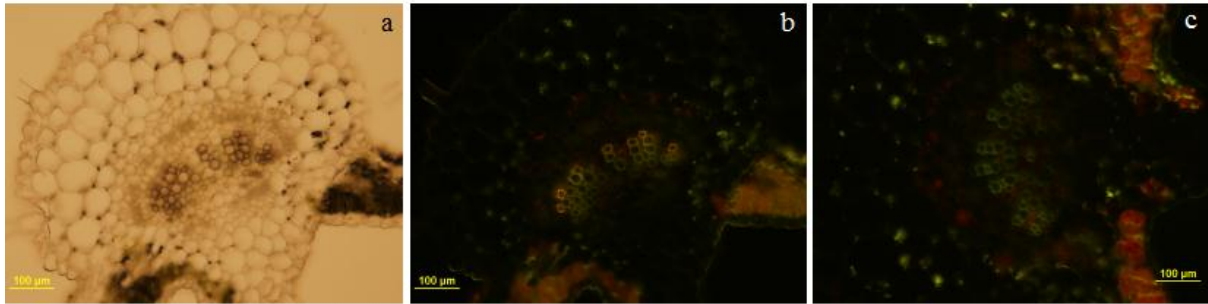
Obr. 14 Anatomie příčného řezu hlavního cévního svazku listu rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur.



Obr. 15 Autofluorescence; a) fotka řezu ve viditelném světle; b) autofluorescence – nebarvená negativní kontrola.



Obr. 16 Detekce $O_2^{\bullet-}$; a) fotka řezu ve viditelném světle; b) negativní kontrola s TEMPO; c) vzorek – fluorescenční signál $O_2^{\bullet-}$.



Obr. 17 Detekce ONOO^- ; a) fotka řezu ve viditelném světle; b) negativní kontrola s ebselenem; c) vzorek – fluorescenční signál ONOO^- .

Problém může představovat autofluorescence. Nastavíme-li dobu expozice tak, aby autofluorescence nebyla vidět, může dojít k potlačení fluorescenčního signálu detekovaných RNS a ROS, nejsou-li dostatečně intenzivní.

Sklička se vzorky zbytečně nevystavujeme světlu. Při práci na mikroskopu pro zaostření použijeme nebarvenou negativní kontrolu ve viditelném světle; u dalších skliček bude dostačující jemné doostření. Řez vzorku vždy pozorujeme a dokumentujeme nejprve s použitím fluorescenčního hranolu a až poté ve viditelném světle, aby nedocházelo ke zbytečnému vysvěcování vzorku. Před pořízením fotky řezu ve viditelném světle neměníme zorné pole.

1.2.6. Kontrolní otázky

- Jaký je princip histochemických metod?
- Popište detekci NO fluorescenční sondou DAF-FM DA.
- Co vzniká reakcí superoxidu s DHE? Překrývá se fluorescenční signál výsledného produktu se signálem jiných molekul a je případně možné signály odlišit?
- Která molekula se používá jako zhášec peroxydusitanu v negativní kontrole? Jak je zajištěno, že se zhášec po reakci s peroxydusitanem převede zpět?
- Které sondy je možné využít pro detekci thiolových skupin?
- Popište princip detekce S-nitrosothiolů.
- Popište autofluorescenci a problémy s ní spojené.

1.3. IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE NITROSOGLUTATHIONU A NITROSOGLUTATHIONREDUKTASY

1.3.1. Teoretický úvod

Imunohistochemie je metoda, při které se ve zkoumaném vzorku prokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek. Používané metody se rozdělují na metody přímé, metody nepřímé dvoustupňové a metody nepřímé trojstupňové. Některá z protilátek (podle typu metody) musí být označena tak, aby bylo možné ji vizualizovat a vyhodnotit rozmístění a intenzitu signálu. Protilátky se používají monoklonální nebo polyklonální, mohou být značené enzymem, kovem nebo fluoresceinem.

Nejjednodušší metodou je metoda přímá, ve které je označena primární protilátka; přímá metoda není příliš citlivá, je možné použít ji pro antigeny, které jsou ve vzorku hojně zastoupeny. Citlivější metodu představuje nepřímá dvoustupňová metoda; v prvním kroku se použije neoznačená primární protilátka specifická proti prokazovanému antigenu; v druhém kroku se použije značená sekundární protilátka specifická proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky (Obr. 18). Nepřímé trojstupňové metody zesilují signál v případech, kdy je množství antigenu ve vzorku nízké; v prvním kroku se použije specifická primární protilátka proti studovanému antigenu; v druhém kroku se použije protilátka specifická proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky a protilátky ve třetí fázi; ve třetím kroku se nanese značený komplex, například peroxidasa-anti-peroxidasový komplex, alkalická fosfatasa-anti-alkalická fosfatasa nebo avidin-biotin komplex.



Obr. 18 Schématické znázornění nepřímé dvoustupňové metody.

V následujícím laboratorním postupu (kapitola 1.3.3. Pracovní postup) je popsána imunochemická detekce GSNO a GSNOR. Pro detekci je v obou případech použita nepřímá dvoustupňová metoda.

Pro detekci GSNO je jako primární protilátka v prvním kroku použita komerční polyklonální krysí protilátka proti GSNO. Sekundární protilátkou je komerční králičí protilátka proti imunoglobulinům krysy, která je fluorescenčně značená. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce 493/518 nm.

Pro detekci GSNOR je jako primární protilátka v prvním kroku použita v laboratoři připravená polyklonální králičí protilátka proti GSNOR. Sekundární protilátkou je komerční kozí protilátka proti imunoglobulinům králíka, která je fluorescenčně značená. Fluorescenční značka se pozoruje při excitační/emisní vlnové délce 493/518 nm.

Pro ověření, že používaný pracovní protokol funguje správně a je specifický pro detekci sledované látky, se používají pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontrola slouží k ověření funkčnosti protokolu. V tomto případě jako kontrola může posloužit vzorek, o kterém je prokázáno, že je pozitivní; jestliže není detekován signál, je třeba pracovní protokol

upravit a optimalizovat. Negativní kontrola slouží k ověření specifity pracovního postupu. Jako negativní kontrola se používají buď preparáty, které neobsahují studovanou látku (antigen), nebo metody, kdy je antigen přítomen, ale primární protilátka se nepoužije, nebo je nahrazena sérem ze stejného zvířete, jež bylo dárce primární protilátky. Nesmí být detekován žádný signál. Problém při pozorování fluorescenčních signálů značených protilátek může způsobovat autofluorescence vzorku, jak je podrobněji popsáno v kapitole 1.2.1. Histochemická detekce reaktivních forem dusíku a kyslíku.

Součástí pracovních protokolů imunohistochemických metod je fixace tkáně, jejímž cílem je zachování struktury buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují zaživa. Pro fixaci lze použít fixační roztoky (aldehydy, alkoholy, kyseliny), fixaci mrazem a fixaci teplem za použití mikrovln.

1.3.2. Experimentální vybavení

Chemikálie:

- 100% glycerol
- PBS (2,5 mM Na-fosfátový pufr pH 7,4, 0,73 mM NaCl, 13 mM KCl)
- primární protilátka – králičí polyklonální protilátka α -GSNOR
- primární protilátka – krysí polyklonální protilátka α -GSNO
- sekundární protilátka – Goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated
- sekundární protilátka – Rabbit anti-rat IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated
- TBSA-BSAT pH 7,6 (5 M Tris, 0,9% NaCl, 0,05% azid sodný, 0,1% BSA, 0,1% Triton X-100)

Laboratorní materiál:

12-jamková mikrotitrační destička, alobal, automatické pipety, bezbarvý lak, košíčky se sítkem, krycí sklíčka, pinzeta, podložní sklíčka, špičky na pipety, štětečky

Biologický materiál:

řezy připravené podle návodu v kapitole 1.1. Příprava rostlinného materiálu

Přístroje:

fluorescenční mikroskop, třepačka

1.3.3. Pracovní postup

- Připravíme si 12-jamkovou mikrotitrační destičku a košíček se sítkem. Inkubace řezů v jamkách destičky, která má řady A-C a sloupce 1-4, je schematicky znázorněna v následujících tabulkách (Tab. 15, 16). V jamkách řady A a B budou inkubovány řezy vzorku, v jamkách řady C budou inkubovány řezy negativní kontroly.
- Protilátky budeme ředit v TBSA-BSAT podle následujícího rozpisu:

detekce GSNO

primární protilátka – krysí polyklonální protilátka α -GSNO 1:2500

sekundární protilátka – Rabbit anti-rat IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 1:1000

detekce GSNOR

primární protilátka – králičí polyklonální protilátka α -GSNOR 1:2500

sekundární protilátka – Goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 1:1000

- Do jamky A1 napipetujeme 2 ml primární protilátky; do jamky C1 napipetujeme 3,5 ml TBSA-BSAT. Do jamek umístíme košíčky se sítkem a do každého košíčku

štetěčkem opatrně přeneseme 7 řezů. Destičku zavřeme víčkem a inkubujeme přes noc do druhého dne při 4°C za velice mírného třepání.

Tabulka 15: Detekce GSNO. Schématické znázornění 12-jamkové mikrotitrační destičky.

	1	2	3	4
A	kryší polyklonální protilátka α -GSNO 2 ml, přes noc, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
B	Rabbit anti-rat IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
C	TBSA-BSAT 3,5 ml, přes noc, 4°C	Rabbit anti-rat IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min

Tabulka 16: Detekce GSNOR. Schématické znázornění 12-jamkové mikrotitrační destičky.

	1	2	3	4
A	králičí polyklonální protilátka α -GSNOR 2 ml, přes noc, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
B	Goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 10 min
C	TBSA-BSAT 3,5 ml, přes noc, 4°C	Goat anti-rabbit IgG (H&L), DyLight® 488 conjugated 2 ml, 1 h, 4°C	TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min	TBSA-BSAT 3,5 ml, 15 min

- Další den řezy vzorku inkubovaného v primární protilátce (jamka A1) promyjeme 3x 10 min v 3,5 ml TBSA-BSAT. Košíček z jamky A1 pinzetou vytáhneme, velice opatrně oklepeme kapičky roztoku, které na něm zůstaly, a přeneseme do další jamky. Destičku zavřeme víčkem a inkubujeme 10 min za velice mírného třepání. Stejný postup opakujeme ve všech krocích promývání (viz Tab. 15, 16).
- Do jamek B1 a C2 napipetujeme 2 ml sekundární protilátky. Do jamek přeneseme košíčky se vzorky po posledním promývacím kroku. Destičku zavřeme víčkem a zabalíme do alobalu. Inkubujeme 1 h při 4°C za velice mírného třepání.
- Řezy vzorku promyjeme 3x 10 min v 3,5 ml TBSA-BSAT; řezy negativní kontroly promyjeme 2x 15 min v 3,5 ml TBSA-BSAT. Při promývání budeme košíček s řezy přenášet do dalších jamek s TBSA-BSAT a inkubovat za velice mírného třepání podle rozpisu (Tab. 15, 16). Pracujeme při co nejmenším osvětlení.
- Po posledním promývacím kroku řezy štetěčkem opatrně přeneseme z košíčků na podložní sklíčka s 50 μ l roztoku PBS:100% glycerol 3:1. Z každé jamky přeneseme na sklíčko 5 řezů. Na řezy položíme krycí sklíčko a jeho kraje přetřeme bezbarvým lakem. Přípravená sklíčka uložíme do tmy a postupně vyhodnotíme.

- Pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujeme příslušné fluorescenční signály. Použijeme hranol U-MWB2. Porovnáme signály negativní kontroly (možná autofluorescence) a vzorků s protilátkami.
- Pomocí digitální kamery nainstalované na mikroskopu zhotovíme snímky, které budou sloužit jako dokumentace výsledků. Každý řez vyfotíme nejprve s použitím hranolu pro fluorescenci a následně ve viditelném světle.

1.3.4. Vyhodnocení výsledků

- Pořídíme fotodokumentaci rostlinných řezů ve viditelném světle a s použitím fluorescenčního hranolu.
- Na fotce řezu ve viditelném světle popíšeme anatomii podle Obr. 13. v kapitole 1.2.4. Vyhodnocení výsledků.
- Na fotkách, které dokumentují fluorescenční signály, popíšeme, v kterých částech listu se vyskytuje GSNO a GSNOR.

1.3.5. Příklady výsledků a možné problémy

Pořízené fotografie zpracujeme a popíšeme. Do protokolu vybereme jednu fotku řezu listu ve viditelném světle a popíšeme anatomii řezu. Dále uvedeme fotografie řezů s detekovaným GSNO a GSNOR a popíšeme, kde jsme GSNO a GSNOR detekovali.

Problém může představovat autofluorescence. Nastavíme-li dobu expozice tak, aby autofluorescence nebyla vidět, může dojít k potlačení fluorescenčního signálu detekovaných RNS a ROS, nejsou-li dostatečně intenzivní.

Sklička se vzorky zbytečně nevystavujeme světlu. Při práci na mikroskopu pro zaostření použijeme nebarvenou negativní kontrolu ve viditelném světle; u dalších sklíček bude dostačující jemné doostření. Řez vzorku vždy pozorujeme a dokumentujeme nejprve s použitím fluorescenčního hranolu a až poté ve viditelném světle, aby nedocházelo ke zbytečnému vysvěcování vzorku. Před pořízením fotky řezu ve viditelném světle neměníme zorné pole.

1.3.6. Kontrolní otázky

- Jaký je princip imunohistochemie?
- Jak se rozdělují imunohistochemické metody?
- Popište nepřímou dvoustupňovou metodu.
- Proč se v imunohistochemii používá pozitivní kontrola a jak vypadá?
- Proč se v imunohistochemii používá negativní kontrola a jak vypadá?

2. LITERATURA

- Akhter S., Green J. R., Root P., Tchatcher G. J., Mutus B. (2003) Peroxynitrite and NO⁺ donors form colored nitrite adducts with sinapinic acid: potential applications. *Nitric Oxide* **8**, 214-221.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2001) Nitric oxide: a nontraditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* **6**, 508-509.
- Cohn C. A., Pedigo C. E., Hylton S. N., Simon S. R., Schoonen M. A. (2009) Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochem Trans*, doi:10.1186/1467-4866-10-8.
- Crawford N. M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 471-478.
- del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Dixon R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998) Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 10328-10333.
- 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.
- Goldstein S, Russo A, Samuni A. (2003) Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with *NO, *NO₂, and O₂*. *J. Biol. Chem.* **278**, 50949-50955.
- Greenberg J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Hogg N., Singh R. J., Joseph J., Neese F., Kalyanaraman B. (1995) Reactions of nitric oxide with nitronyl nitroxides and oxygen: prediction of nitrite and nitrate formation by kinetic simulation. *Free Radic Res* **22**, 47-56.
- Itoh Y., Ma F. H., Hoshi H., Oka M., Noda K., Ukai Y., Kojima H., Nagano T., Toda N. (2000) Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal. Biochem.* **287**, 203-209.
- 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.
- Kavya R., Saluja R., Singh S., Dikshit M. (2006) Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* **15**, 280-294.
- Keller T., Damude H. G., Werner D., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255-266.
- Klepper L. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos. Environ.* **13**, 537-542.
- Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. (1999) Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 3209-3212.
- Knowles R. G., Moncada S. (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-258.
- Kranner I., Roach T., Beckett R. P., Whitaker C., Minibayeva F. V. (2010) Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* **167**, 805-811.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., Pagnussat G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 109-136.

- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., Chen H. S., Sucher N. J., Loscalzo J., Singel D. J., Stamler J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626-632.
- 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.
- Low P. S., Merida J. R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**, 533-542.
- Masumoto H., Sies H. (1996) The reaction of ebselen with peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* **9**, 262-267.
- Mur L. A. J., Carver T. L. W., Prats E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**, 489-505.
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**, 11-35.
- Samuni A., Krishna C. M., Mitchell J. B., Collins C. R., Russo A. (1990) Superoxide reaction with nitroxides. *Free Radic Res Commun.* **9**, 241-249
- Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., Nagano T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* **278**, 3170-3175.
- Thomas D. D., Liu X., Kantrow S. P., Lancaster J. R. (2001) The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 355-360.
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., Colmenero-Varea P., Del Río L. A., Barroso J. B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* **581**, 453-461.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D. F., Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.
- Wink D. A., Mitchell J. B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434-456.
- Wojtaszek P. (2000) Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**, 1-4.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **4**, 128-129.
- Zaninotto F., La Camera S., Polverari A., Delledonne M. (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.* **141**, 379-383.
- Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5727-5732.
- Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic. Biol. Med* **34**, 1359-1368.

3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-OH-E ⁺	2-hydroxyethidium
α -GSNO	kryší polyklonální protilátka proti GSNO
α -GSNOR	králičí polyklonální protilátka proti GSNOR
Af-M	Alexa Fluor® 488 C ₅ Maleimid
APF	3'-(<i>p</i> -aminofenyl)fluorescein
BSA	hovězí sérový albumin
cPTIO	2-4-karboxyfenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
DAF-2	4,5-diaminofluorescein
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein
DAF-FM DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetát
DAF-x T	triazofluorescein
DHE	dihydroethidium (hydroethidin)
DMSO	dimethylsulfoxid
DTPA	diethylentriaminpentaoctová kyselina
E ⁺	ethidium
eNOS	endoteliální NOS
FAD	flavinadenindinukleotid
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FMN	flavinmononukleotid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
H ₂ DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
H ₂ DCF DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HO [•]	hydroxylový radikál
HPF	3'-(<i>p</i> -hydroxyfenyl)fluorescein
HR	hypersenzitivní reakce
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
iNOS	inducibilní NOS
NEM	N-ethylmaleimid
NiNOR	nitrit:NO reduktasa
nNOS	neuronová NOS
NO	oxid dusnatý
NO ⁺	nitrosoniový kation
NO [•]	nitroxylový radikál
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
¹ O ₂	singletový kyslík
O ₂ ^{•-}	superoxidový anion-radikál
⁻ OCI	hypochlorit
[•] O ₂ H	perhydroxylový radikál
OH ⁻	hydroxylový ion
ONOO ⁻	peroxydusitanový anion
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku

RSNO	S-nitrosothioly
TEMPAMIN	4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan