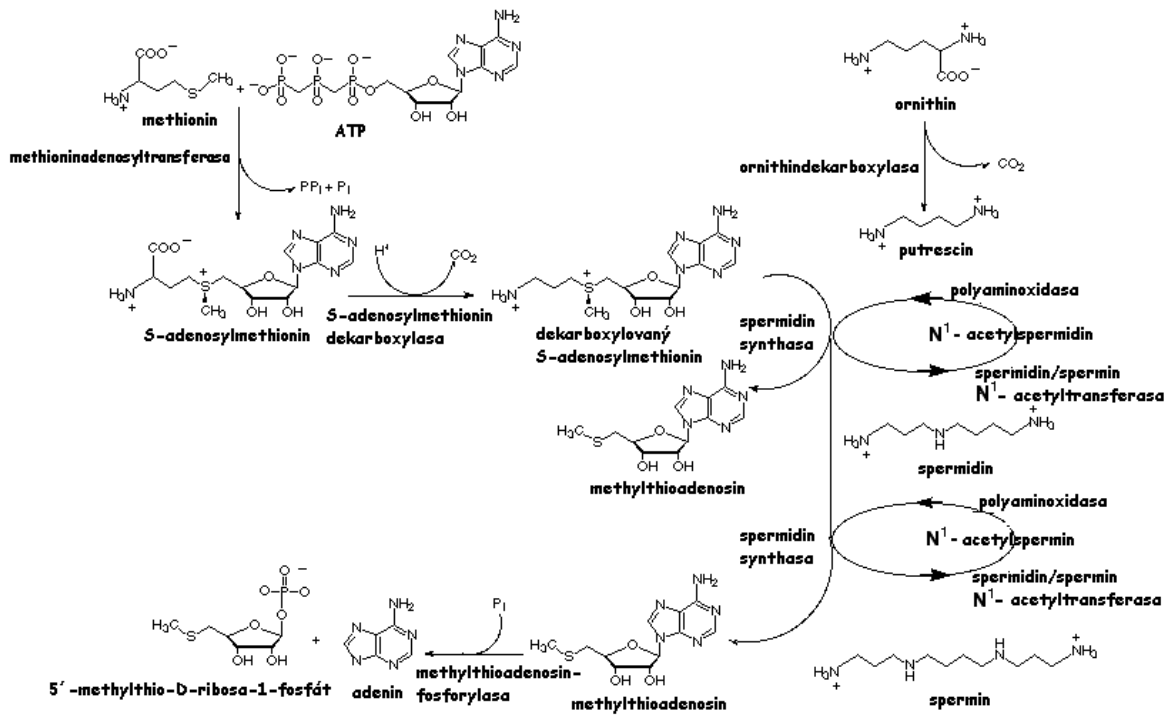


18. ANALÝZA POLYAMINŮ V ROSTLINNÉM MATERIÁLU METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ

1. Teoretický úvod:

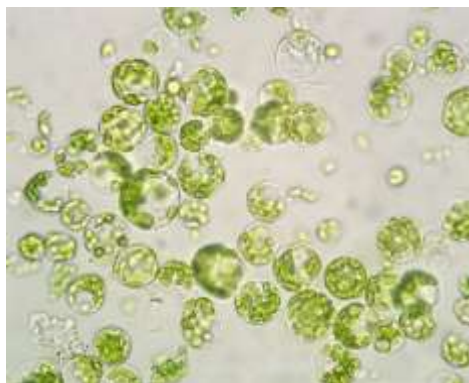
Polyaminy jsou nízkomolekulární polykationty vyskytující se u všech organismů včetně živočichů, rostlin, hub a bakterií. V organismech se nacházejí hlavně tyto polyaminy: putrescin (butan-1,4-diamin), kadaverin (pentan-1,4-diamin), spermidin ([N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin]) a spermin ([N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin]). U rostlin jsou polyaminy lokalizovány především v cytoplasmě, dále ve vakuolách, mitochondriích a chloroplastech. Prekursory biosyntézy polyaminů jsou aminokyseliny L-arginin a L-methionin (**Obr. 1**). Syntéza putrescinu probíhá přes ornithin, který je produkován z argininu za katalýzy enzymem arginasou (EC 3.5.3.1) a ornithindekarboxylasou (EC 4.1.1.17). Druhou alternativní cestou je syntéza putrescinu z agmatinu třemi následnými reakcemi katalyzovanými arginindekarboxylasou (EC 4.1.1.19), agmatiniminohydrolasou (EC 3.5.3.12) a N-karbamoylputrescinamidohydrolasou (EC 3.5.1.53). Přeměna putrescinu na spermidin probíhá za účasti enzymu spermidinsynthasy (EC 2.5.1.16). Dekarboxylovaný S-adenosylmethionin syntetizovaný z methioninu ve dvou následných reakcích katalyzovaných methioninadenosyltransferasou (EC 2.5.1.6) a S-adenosylmethionindekarboxylasou (EC 4.1.1.50) je donorem aminopropylové skupiny. Syntézy sperminu se účastní enzym sperminsynthasa (EC 2.5.1.22). Diamin kadaverin je syntetizován z L-lysinu za účasti enzymu lysindekarboxylasy (LDC, EC 4.1.1.18). Degradace polyaminů se účastní enzym polyaminoxidasa (EC 1.5.3.11-17) s kofaktorem flavinadenindinukleotidem (FAD). Rostlinná polyaminoxidasa katalyzuje přeměnu spermidinu a sperminu na 4-aminobutanal nebo N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal za současné tvorby propan-1,3-diaminu a peroxidu vodíku. Na katabolismu polyaminů se dále podílí i Cu^{2+} diaminoxidasa (DAO, EC 1.4.3.6). DAO upřednostňuje odbourávání diamínů, katalyzuje oxidaci putrescinu na 4-aminobutanal za současné tvorby amoniaku a peroxidu vodíku. Vzniklý aminoaldehyd je následně metabolizován na γ -aminomáselnou kyselinu přes Δ^1 -pyrrolin. DAO analogicky odbourává i diamin kadaverin.

Polyaminy hrají důležitou roli v řadě fyziologických procesů, mezi něž patří růst kořenů, somatická embryogeneze, iniciace kvetení, vývoj květů a plodů. Je známo, že se polyaminy akumulují v rostlinách jako odezva na působení abiotických i biotických stresových faktorů. Byla prokázána zvýšená hladina polyaminů po působení osmotického stresu u kukuřice, čiroku, rýže a rajčete. Během působení stresového faktoru se nevytvářejí pouze volné polyaminy, ale i jejich konjugáty. Syntéza těchto konjugátů je založena na posttranslačním vazbě na proteiny za účasti enzymů transglutaminas (EC 2.3.2.13.). Rovněž bylo zjištěno, že transglutaminasy mohou být stresem indukovatelné. Významným polyaminovými konjugáty jsou konjugáty s kyselinou skořicovou, který má zvýšenou schopnost vazby vycíhat reaktivní formy kyslíku. Rostliny vystavené stresu jsou schopné produkovat konjugáty polyaminů ke zlepšení antioxidantního obranného mechanismu a zmírnit tím poškození organismu. Závisí to ovšem také na druhu rostliny, obsahu polyaminů a fenolických sloučenin jako substrátů pro produkci jejich konjugátů.



Obr. 1 Biosyntéza polyaminů

Protoplasty jsou rostlinné buňky, které byly zbaveny své buněčné stěny působením enzymatických roztoků s celulasovou a pektinasovou aktivitou na pletiva. Jsou vhodným modelovým systémem studium struktury a funkce buněčných organel, cytoplazmatické membrány, membránového v rostlinách a syntézy buněčné stěny. Vhodným zdrojem protoplastů jsou mladé, plně vyvinuté listy z *in vitro* rostoucích rostlin, umožňující izolaci velkého množství relativně uniformních buněk. Hustota a životaschopnost izolovaných protoplastů závisí na koncentraci použitých enzymů, době působení, pH enzymatického roztoku, teplotě a poměru enzymatického roztoku k množství rostlinného pletiva. V izolovaných protoplastech je tlak chybějící buněčné stěny na protoplast nahrazen vhodnými osmotickými hodnotami použitých enzymatických, promývacích roztoků a kultivačních médií. U protoplastových suspenzí lze využít flotace protoplastů v gradientu, kdy jsou protoplasty smíchány s 20% sacharosou a převrstveny promývacím médiem. Po centrifugaci jsou flotující protoplasty sbírány z prstence na horní vrstvě sacharosy, zatímco organely a zbytky buněk jsou v sedimentu na dně centrifugační zkumavky.



Obr. 2 Protoplasty izolované z *Cucumis sativus*

2. Materiál a metody:

Důležité upozornění: Metoda HPLC je náročná na čistotu použitých chemikálií po stránce chemické (nečistoty interferují s detekcí analytů na detektoru HPLC) a fyzikální (mechanické částice mohou způsobit poškození nebo ucpání jemných pórů stacionární fáze kolony). Proto je k přípravě činidel a mobilních fází nutno vždy používat speciální chemikálie označované stupněm čistoty „HPLC grade“, případně „HPLC Gradient Grade“. Vodu a vodné roztoky solí je zcela bezpodmínečně nutné připravit pouze z deionizované vody a bezprostředně před použitím přefiltrovat 40 µm filtrem Millipore.

2.1. Roztoky a přístroje

- ✓ 5% kys. trichloroctová (TCA) – rozpuštění 1 g krystalické TCA ve 20 ml deionizované vody
- ✓ 10 mM amoniak – 2,33 µl amoniaku do 10 ml deionizované vody
- ✓ Derivatizační činidlo – 5 mg dansylchloridu v 1 ml acetonu – vzhledem k fotolabilitě uchovávat v temnu (připravuje se vždy čerstvě)
- ✓ Standardy polyaminů - putrescin, kadaverin, spermidin, spermin (všechny 1 mM roztoky v deionizované vodě)
- ✓ HPLC systém „Gold“ Beckman, 126NM – HPLC pumpy A a B, 168NM - spektrofluorimetrický detektor FP-2020 Plus (Jasco), injektor Rheodyne s injekční smyčkou o objemu 20 µl, kolona Zorbax Eclipse XDB C18 (150 × 4,6 mm, velikost částic 5 µm). mobilní fáze - MeOH (čistota HPLC), deionizovaná voda - přefiltrovaná na 40 µm Millipore filtru

2.2. Rostlinný materiál

Příprava protoplastů:

- 1) Do sterilní Petriho misky napipetujeme 5 ml enzymatického roztoku.
- 2) Sterilní pinzetou a skalpelem oddělíme mladé listy okurky seté a přeneseme je do Petriho misky, pomocí skalpelu nařezeme tyto listy na tenké proužky a necháme 18 hodin působit enzymatický roztok při laboratorní teplotě. Přitom nezapomeneme zvážit hmotnost použitého rostlinného materiálu.
- 3) Druhý den přefiltrujeme hrubou protoplastovou suspenzi přes sítko, promyjeme 5 ml roztoku PGLy a centrifugujeme 5 min při 800 rpm.
- 4) Supernatant odsajeme a precipitát resuspendujeme v 4 ml 20% sacharosy, poté převrstvíme 2 ml promývacího roztoku PGLy a centrifugujeme 10 min při 800 rpm.
- 5) Vzniklý prstenec tvořený protoplasty na rozhraní těchto dvou kapalin přeneseme Pasteurovou pipetou do nové zkumavky a resuspendujeme ve 4 ml roztoku PGLy. Poté opět centrifugujeme 5 min při 800 rpm.
- 6) Odstraníme supernatant a precipitát resuspendujeme v 1 ml média LCM1.

Abiotický stres protoplastů: Protoplasty inkubovat 1hod v médiu obsahujícím 50 µM CdCl₂ (91,7 mg CdCl₂ rozpustit v 10 ml média)

3. Postup

3.1. Extrakce polyaminů kyselinou trichloroctovou

- 1) Vyizolované protoplasty centrifugujeme 10 min při 400g.
- 2) K 0,5 ml sedimentu protoplastů přidáme 1,5 ml 5% trichloroctové kyseliny.
- 3) Sonikujeme 5 min na ultrazvukové lázni.
- 4) Centrifugujeme 5 min na 12000 rpm.

3.2. Derivatizace biogenních aminů – pozor po přidání derivatizačního činidla – fotolabilita vzorků, uchovávat zabalené v alobalu!

- 1) K 1 ml extraktu přidáme 0,1 ml vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan) o koncentraci 1 mg/ml, smícháme s 0,5 ml nasyceného uhličitanu sodného.
- 2) Přidáme 1 ml derivatizačního činidla, promícháme 1 min na míchače.
- 3) Derivatizaci necháme probíhat 1 h při 40°C ve tmě.
- 4) Po derivatizaci přidáme 250 µl 10 mM amoniaku a opět mícháme 1 min na míchače. Amoniak zreaguje s přebytkem dansylchloridu.
- 5) Po 30 min reakce extrahujeme hydrofobní deriváty diethyletherem (3x 1 ml).
- 6) Organickou fází odpaříme do sucha proudem dusíku.
- 7) Odparek rozpustíme v 0,5 ml acetonitrilu, pokud se jedná o standard - v 1 ml acetonitrilu.
- 8) Přefiltrujeme přes membránový filtr 0,40 µm.

3.3. Separace a analýza metodou HPLC

- 1) **Příprava přístroje** – pod dohledem vedoucího cvičení spustíme postupně pumpy, detektor a řídicí PC. Spustíme HPLC software „Gold Nouveau“, použijeme řídicí modul „Instrument 1“ a v něm spustíme ovládací okno přístroje „Direct Control“. Zkontrolujeme otevření odpadního ventilu a podle pokynů vedoucího propláchneme hadičky (pozice trojcestného ventilu „Prime Lines“) a píсты (pozice trojcestného ventilu „Prime Pumps“) pump A a B a poté pumpy propláchneme každou 1min při průtoku 10ml/min (ventil v pozici „Operate“).
- 2) Nastavíme složení mobilní fáze, uzavřeme odpadní ventil a bez zapojené HPLC kolony průtokem 5 ml/min propláchneme detektorovou celou.
- 3) Nastavíme průtok na 0,8 ml/min a zapojíme použitou HPLC kolonu – pozor na **zapojení ve správném směru**, naznačeném graficky šipkou na těle kolony!
- 4) Kolonu necháme propláchnout po dobu 10 min. Správnou funkci kolony a výstup signálu detektoru zkontrolujeme pomocí funkce „Preview“. Teplota kolony: 25 °C.
- 5) Otevřeme uloženou metodu „dansylderiv.met“ s parametry průtok 0.8 ml/min, výchozí složení mobilní fáze 55% MeOH, gradient z 55% na 65% od 5:00 min do 10:00 min a zpět gradient na 55% od 15 do 17min, konec analýza ve 20min. Spustíme analýzu tlačítkem „Single Run“ a v dialogovém okně zadáme metodu a název souboru pro uložení dat, případně doplníme popis experimentálních podmínek a poznámky v „Description“.
- 6) Otočíme injekční ventil do polohy „Load“ (nahore), pomocí Hamiltonovy stříkačky **s tupým koncem** nastříkáme do smyčky o objemu 20 µl objem cca 50 µl vzorku (pro dosažení dokonalého naplnění kapiláry vzorkem) a otočením ventilu dolů do polohy „Inject“ spustíme vlastní analýzu.
- 7) Po skončení běhu HPLC provedeme analýzu chromatogramu při $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/500$ nm tlačítkem „Analyse“ a odečteme hodnoty retenčního času a plochy chromatografických píků. Provedeme postupně analýzu standardů a vzorků.

4. Vyhodnocení:

Provedeme analýzu a srovnání retenčních časů chromatografických píků při $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/500$ nm a identifikujeme polyaminy ve vzorcích protoplastů. Porovnáním plochy polyaminů u jednotlivých standardů a plochu příslušných píků ve vzorcích použijeme pro kvantifikaci.

5. Kontrolní otázky:

1. Jaký je fyziologický význam polyaminů u rostlin?

19. ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK A FLAVONOIDŮ METODOU HPLC

1. Teoretický úvod

Průběh obranné reakce rostlin lze rozdělit na ranou a pozdní fázi. **Ranou fází obranné reakce rostlin** nazýváme děje probíhající bezprostředně po kontaktu patogena s hostitelskou buňkou. Ta nastává již během několika minut po interakci. Po rozpoznání patogena je spuštěna signální kaskáda vedoucí ke vzniku obranné reakce. Dojde ke specifickým fyziologickým dějům, kam řadíme depolarizaci cytoplasmatické membrány. Zde dochází k toku K^+ a Cl^- iontů z buňky a dovnitř vstupuje Ca^{2+} . Velmi rychlou odpovědí na stres v intervalu kratším než 5 minut je produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). V reakci katalyzované NADPH-oxidase vzniká superoxidový anionradikál, který je rychle účinkem superoxidodismutasy rozkládán na peroxid vodíku. ROS hrají roli v procesu změn a zesílení struktur buněčné stěny, která tak představuje fyzickou bariéru vůči napadení patogenem. Peroxid vodíku je také důležitý prvek aktivující syntézu kyseliny salicylové a expresi řady obranných genů. Za nejvýznamnější zdroj ROS jsou považovány chloroplasty, které při fotosyntéze absorbují velké množství energie, což má za následek zvýšení koncentrace kyslíku. V rané fázi také dochází ke tvorbě NO (oxidu dusnatého), který se účastní iniciace a rozvoje hypersenzitivní reakce (HR) rostlin. Při HR nedochází jen ke zničení patogena, ale zničí se i všechny infikované a sousední buňky. HR patří mezi nejúčinnější obranné mechanismy rostlin. Během **pozdní fáze**, která trvá několik hodin až dnů, dochází ke tvorbě kyseliny salicylové, méně často jasmonové. Tyto kyseliny indukují systémovou rezistenci, kdy je signál šířen v celé rostlině. **SAR** (*systemic acquired resistance*) – systémově získaná rezistence – je nespecifická, pouze dočasná a chrání rostliny před širokou škálou biotrofních patogenů. Pro její aktivaci je nutný proces nekrózy způsobených bakteriální, houbovou či virovou infekcí. Bylo dokázáno, že pro dosažení rozvoje SAR musí nejdříve dojít k nahromadění kyseliny salicylové. Mechanismus působení SAR není zcela objasněn. **ISR** (*induced systemic resistance*, systémově vyvolaná rezistence) znamená, že rostliny jsou rezistentní vůči nekrotrofním patogenům. Také dochází ke zvýšené produkci fytoalexinů. Dále jsou tvořeny tzv. pathogen related proteiny (PR proteiny), které se podílejí na aktivní obraně rostlin. PR proteiny jsou stresové proteiny, které se nevyskytují u zdravých rostlin, ale jsou syntetizovány ve velkém množství až po napadení patogenem. Dosud bylo identifikováno 17 skupin PR proteinů.

Polyfenoly patří v rostlinné říši k hojně zastoupeným látkám. Jsou to různorodé látky, sloužící jako stavební a strukturální složky. Polyfenolům se přisuzují chuťové, vonné a barevné vlastnosti květů a plodů, dále také působí jako obranné látky chránící před škůdci a infekcemi. Polyfenoly jsou skupiny látek, které jsou charakterizovány přítomností jednoho nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami. Polyfenoly se obecně dělí na hydrolyzovatelné taniny (estery kyseliny gallové a glukosy nebo jiných cukrů) a fenylpropanoidy (například ligniny, flavonoidy a kondenzované taniny). Rozdělení polyfenolů není jednoduché a často se setkáváme s různými variantami jejich klasifikace. Například je možné klasifikovat polyfenoly podle jednotlivých subkomponent, ze kterých příslušné polymery vznikají. Dále je možné rozdělení podle počtu uhlíků a jejich vazeb nebo také podle počtu aromatických kruhů a jejich vzájemných vazeb. Polyfenoly se klasifikují také podle typu a počtu přítomných fenolických subkomponent. V daném polyfenolu může být obsažena více než jedna subkomponenta.

Tab. 1: Možné fenolické subkomponenty a příklady příslušných polyfenolů

Subkomponenty	Příklady polyfenolů
Fenol	ligniny odvozené od kyseliny kumarové, kampeferol
Pyrokatechol	katechin, kvercetin, ligniny odvozené od kyseliny kávové a ferulové, estery hydroxytyrosolu
Pyrogallol	gallokatechiny, taniny, myricetin, ligniny odvozené od sinapylalkoholu
Resorcinol	resveratrol
Floroglucinol	téměř všechny flavonoidy
Hydrochinon	arbutin

Tab. 2: Typy fenolických látek podle počtu uhlíků

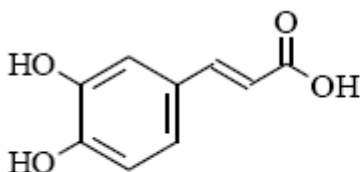
Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklad
C6	6	Jednoduché fenoly	Katechol
C6-C1	7	Fenolické kyseliny	Kys. salycilová
C6-C3	9	Fenylpropanoidy	Chromen
C6-C2-C6	14	Stilbeny	Resveratrol
C6-C3-C6	15	Flavonoidy	Kvercetin
(C6-C3) ₂	18	Lignany	Yatein
(C6 ₃ -C6) ₂	30	Biflavonoidy	Amentoflavon
(C6-C3-C6) _n	n	Flavolany	Gallotaniny
(C6-C3) _n	n	Ligniny	-
(C6) _n	n	Katecholmelaniny	Rostlinné pigmenty

Polyfenolické sloučeniny se mohou dělit také podle počtu aromatických kruhů a způsobu vazby mezi nimi:

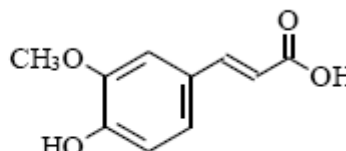
- A) Fenolické kyseliny
- B) Lignany
- C) Flavonoidy (dělí se dále na třídy)
- D) Stilbeny

1.1. Fenolické kyseliny

Fenolové kyseliny, např. kyselina kávová, ferulová nebo gallová, se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejběžnější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová neboli 5-kofeylchinová kyselina.



Kyselina kávová



Kyselina ferulová

1.2. Lignany

Lignany tvoří jednu z bohatě zastoupených, biogeneticky příbuzných a charakteristických skupin fenyylpropanoidů. Lignany jsou striktně definovány jako dimery vzniklé oxidativní dimerizací dvou fenyylpropanových jednotek spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců v polohách C-8 a C-8'. Propojením dalších vazeb C-C a C-O, za spoluúčasti propanových částí molekuly v různém oxidačním stupni, vznikají všechny možné strukturní typy a formy lignanů.

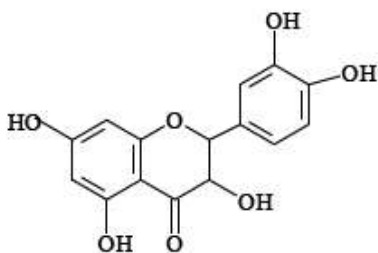
1.3. Flavonoidy

V současné době je známo více než 6 400 různých flavonoidů vyskytujících se v rostlinné říši. Jejich základní strukturu tvoří flavanové jádro nebo 2-fenyl-benzo- γ -pyren. Tato struktura je charakteristická pro 3-deoxyflavonoidy (flavony, flavanony, isoflavony a neoflavony) a 3-hydroxyflavonoidy (flavonoly, antokyaniny, flavanoly). Flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Tato forma jim umožňuje vyšší rozpustnost v běžných fyziologických podmínkách a zároveň snižuje jejich reaktivitu a zabezpečuje lepší stabilitu. Glykosidovou částí flavonoidů bývá obvykle glukosa, galaktosa, xylosa a arabinosa. Flavonoidy jsou přítomné přibližně v 80 % vyšších rostlin.

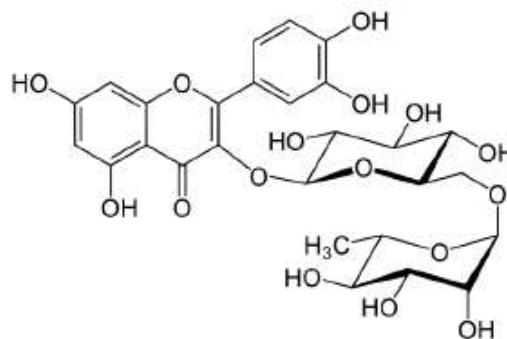
1.4. Flavonoly

Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol *kvercetin*. Nachází jednak ve formě volné, jednak vázán s cukernými jednotkami, např. jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4'-O-glukosid, kvercetin-3-O-rhamnosid. Kvercetin se vyskytuje ve vysokých koncentracích v běžně přijímaných potravinách jako cibule (300 mg.kg-1 čerstvé váhy), jablka (21 - 72 mg.kg-1), kapusta (100 mg.kg-1), červené víno (4 - 16 mg.l-1), zelený a černý čaj (10 - 25 mg.l-1).

Rutin (kvercetin-3-O-rhamnoglukosid) je součástí léků používaných jako venofarmaka. Má řadu pozitivních zdravotních účinků, mezi jeho největší přínosy patří především schopnost léčit křehkost krevních kapilár a zvyšovat pružnost cév. Snižuje LDL cholesterol. Také je významná jeho antioxidační aktivita a s tím související antikarcinogenní účinky a schopnost zhaset volné radikály. Zesiluje účinek vitamínu C.

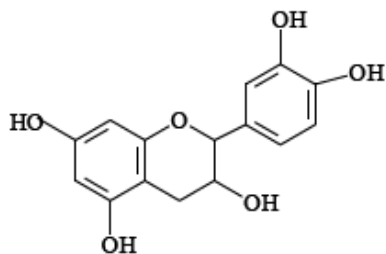


Kvercetin



Rutin

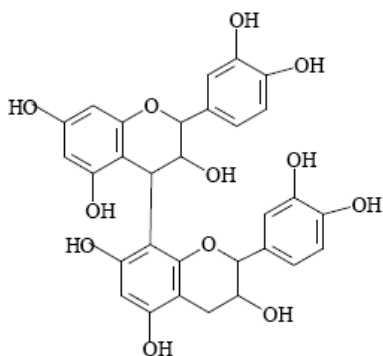
Flavanoly můžeme nalézt buď jako monomery nebo polymery. Mezi jejich typické zástupce patří např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou gallovou.



Catechin

1.5. Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny jsou polymerní flavanoly. Jsou přítomny v rostlinách jako komplexní směsi polymerů. Vyskytují se také vázány esterově s kyselinou gallovou nebo ve formě dvojité spojených dimerů.



Proanthokyanidin

1.6. Anthokyaniny

Anthokyaniny jsou blízké deriváty flavonolu, avšak obsahují místo karbonylové skupiny – CO– oxoniovou skupinu. V rostlinách se nacházejí jako barviva, pro která je charakteristická červená, modrofialová až modrá barva květů, listů a plodů.

2. Materiál a chemikálie:

Důležité upozornění: Metoda HPLC je náročná na čistotu použitých chemikálií po stránce chemické (nečistoty interferují s detekcí analytů na detektoru HPLC) a fyzikální (mechanické částice mohou způsobit poškození nebo ucpání jemných pórů stacionární fáze kolony). Proto je k přípravě činidel a mobilních fází nutno vždy používat speciální chemikálie označované stupněm čistoty „HPLC grade“, případně „HPLC Gradient Grade“. Vodu a vodné roztoky solí je zcela bezpodmínečně nutné připravit pouze z deionizované vody a bezprostředně před použitím přefiltrovat 40 μm filtrem Millipore.

2.1. Roztoky a chemikálie

- Extrakční činidlo: 2 N NaOH s 10 mM EDTA a 1% kyselinou askorbovou
- Mobilní fáze: A - 5% acetonitril s 0,1% kyselinou fosforečnou, B - 80% acetonitril s 0,1% kyselinou fosforečnou

- HPLC systém „Gold“ Beckman 126NM – HPLC pumpy A a B, 168NM - Detektor UV/VIS s diodovým polem, injektor Rheodyne s injekční smyčkou o objemu 20 µl, kolona Phenomenex Gemini 5µ C18 110A (250 × 3 mm)

2.2. Rostlinný materiál

Patogen padlí rajčatové (*Oidium neolyopersici* (C2)), získaný z rajčete (*L. esculentum* cv. Lucy) ze skleníku Státní rostlinolékařské správy (Olomouc) je udržovaný na 2-3 měsíce starých rostlinách vysoce náchylného genotypu rajčete (*S. lycopersicum* cv. Amateur) pěstovaných ve fytotronu při teplotě 18-20 °C a se světelným režimem 12/12 h (den/noc). Ve dvoutýdenních intervalech je padlí rajčatové přeinkulováno vždy na nové čisté rostliny. Inokulace rostlin patogenem *O. neolyopersici* se provádí na začátku světelné fáze metodou otisku infikovanými listy *S. lycopersicum*, cv. Amateur, které byly z 80-100 % pokryty čerstvým sporulujícím myceliem. Po inokulaci jsou rostliny infikované a kontrolní kultivovány odděleně ve fytotronech při teplotě 20 °C a se světelným režimem 12/12 h. Odběry vzorků se provádí v časových intervalech 8, 24, 48, 72 h po inokulaci (hpi).

3. Postup:

Příprava vzorku pro analýzu metodou HPLC

- 1) Navážku 200 mg listů rajčete (kontrolní neinfikované list a infikované listy) homogenizujeme v tekutém dusíku.
- 2) Homogenát přeneseme do 15ml centrifugační zkumavky s 5 ml roztoku 2 N NaOH s 10 mM EDTA a 1% kyselinou askorbovou.
- 3) Necháme inkubovat 30 min při 40-45°C, poté přidáme 1,4 ml 7,2 N HCl a vortexujeme 5-10 s.
- 4) Fenolické kyseliny extrahujeme ethylacetátem (2x 6,4 ml). Spojené organické vrstvy odpaříme do sucha v proudu dusíku.
- 5) Odparek rozpustíme ve 2 ml roztoku methanol:voda (75:25 %, v/v), sonikujeme 5 min.
- 6) Před samotnou analýzou extrakt filtrujeme přes PVDF filtr (0,45 µm).

Separace a analýza metodou HPLC

- 1) **Příprava přístroje** – pod dohledem vedoucího cvičení spustíme postupně pumpy, detektor a řídicí PC.
- 2) Spustíme HPLC software „Gold Nouveau“, použijeme řídicí modul „Instrument 1“ a v něm spustíme ovládací okno přístroje „Direct Control“. Zkontrolujeme otevření odpadního ventilu a podle pokynů vedoucího propláchneme hadičky (pozice trojcestného ventilu „Prime Lines“) a píсты (pozice trojcestného ventilu „Prime Pumps“) pump A a B a poté pumpy propláchneme každou 1min při průtoku 10ml/min (ventil v pozici „Operate“).
- 3) Nastavíme složení mobilní fáze, uzavřeme odpadní ventil a bez zapojené HPLC kolony průtokem 5 ml/min propláchneme detektorovou celu.
- 4) Nastavíme průtok na 0,5 ml/min a zapojíme použitou HPLC kolonu – pozor na **zapojení ve správném směru**, naznačeném graficky šipkou na těle kolony!
- 5) Kolonu necháme propláchnout po dobu 10 min. Správnou funkci kolony a výstup signálu detektoru zkontrolujeme pomocí funkce „Preview“. Teplota kolony: 25 °C.

- 6) Otevřeme uloženou metodu „C18fenolicke.met“ s parametry průtok 0.5 ml/min, výchozí složení mobilní fáze A - 5% acetonitril s 0,1% kys. fosforečnou, B - 80% acetonitril s 0,1% kys. fosforečnou, gradient: od A/B (10 : 90) do A/B (35 : 65) v 55 min.
- 7) Spustíme analýzu tlačítkem „Single Run“ a v dialogovém okně zadáme metodu a název souboru pro uložení dat, případně doplníme popis experimentálních podmínek a poznámky v „Description“
- 8) Otočíme injekční ventil do polohy „Load“ (nahore), pomocí Hamiltonovy stříkačky **s tupým koncem** nastříkneme do smyčky o objemu 20 μ l objem cca 50 μ l vzorku (pro dosažení dokonalého naplnění kapiláry vzorkem) a otočením ventilu dolů do polohy „Inject“ spustíme vlastní analýzu.
- 9) Po skončení běhu HPLC provedeme analýzu chromatogramu při vlnové délce 220 nm tlačítkem „Analyze“ a odečteme hodnoty retenčního času a plochy chromatografických píků.
- 10) Provedeme postupně analýzu standardů a vzorků.

4. Vyhodnocení:

- a) Provedeme analýzu a srovnání retenčních časů chromatografických píků při vlnové délce 220 nm, identifikujeme fenolické látky a flavonoidy.
- b) V tabulce přehledně uvedeme identifikované analyty ve vzorku neinfikovaného a infikovaného listu. Kvantifikujeme jejich množství v $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé váhy.

5. Kontrolní otázky:

1. Popište rozdíly mezi ranou a pozdní fází obranné reakce rostlin.
2. Jaký je význam systémově získané rezistence?
3. Stručně shrňte význam polyfenolů u rostlin.

20. KVANTIFIKACE AKUMULACE STRESOVÝCH PROTEINŮ VE VZORCÍCH ROSTLIN METODOU WESTERN BLOT

1. Teoretický úvod:

Živé organismy jsou schopny potlačit nebo zastavit syntézu řady proteinů a naopak syntetizovat nové proteiny jako odpověď k abiotickému environmentálnímu stresu. Organismy vystavené vysokým neletálním teplotám, tj. teplotám, které jsou pro daný organismus nad prahem jeho optima, spouští *de novo* syntézu charakteristických proteinů, tzv. heat shock proteinů (Hsps). Dochází k fyziologické odpovědi na teplotní stres, označované jako *heat shock odpověď* (**HSR**), která je jednou z nejméně evolučně konzervovaných biochemických drah v přírodě. HSR vede k ochraně buněk před poškozením, k obnově normálních buněčných a fyziologických aktivit a k dosažení vyšší úrovně termotolerance. V živých systémech se většina Hsps nachází konstitutivně, avšak působením stresových faktorů a během různých vývojových stádií organismu dochází k jejich intenzivní expresi. Zvýšenou produkci Hsps vyvolávají environmentální (stresové) podmínky (např. působení vysoké teploty, inkorporace těžkými kovy a analogy aminokyselin, hodnota extracelulárního pH, dále pak působení detergentů, peroxidu vodíku a močoviny), patofyziologické podmínky (virální nebo bakteriální infekce, intracelulární hladina vápníku a hodnota intracelulárního pH) a nestresové podmínky (diferenciace a vývoj, stádia buněčného cyklu). Hsps mají hlavní funkci jako molekulární chaperony, dokáží rozpoznat proteiny, které jsou v nestabilním, inaktivním stavu a interagovat s nimi. Molekulární chaperony jsou definovány jako rodina strukturně nepříbuzných celulárních proteinů, které se účastní translokace, skládání, uspořádání a degradace proteinů, a to zejména stabilizací částečně nesložených forem, avšak netvoří složky jejich finálních struktur. Chaperony se účastní skládání nově syntetizovaných proteinů a udržují proteiny v jejich funkční konformaci. Chaperony neobsahují informaci pro správné složení, ale spíše ochraňují proteiny před jejich agregací. Hsps jsou klasifikovány podle molekulové hmotnosti do pěti hlavních rodin : nízkomolekulární malé Hsp (sHsp), Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100. U eukaryot jsou jednotlivé rodiny dále rozlišovány na podrodiny a skupiny lišící se inducibilitou, intracelulární lokalizací a funkcí.

Hsp70/DnaK (69-71 kDa) jsou považovány za jedny z nejvýznamnějších proteinů indukovaných teplotním stresem. Hsp70 proteiny mají dvě hlavní funkční domény. N-terminální doména (~40kDa) váže ATP a hydrolyzuje ho na ADP. C-terminální doména (~25 kDa) zodpovídá za vazbu substrátových proteinů a polypeptidů. Domény odděluje krátká spojující sekvence, která je náchylná na štěpení proteasou. Hsp70 mají významnou funkci v ochraně proteinů před agregací, podílí se na skládání proteinů a při tvorbě jejich nativní konformace. Dále se účastní proteinového importu, translokačních procesů a usnadňují proteolytickou degradaci tak, že nestabilní proteiny nasměrují do lysosomů nebo proteasomu. U řady proteinů z rodiny Hsp70 bylo popsáno zapojení v importu a translokaci proteinů do chloroplastů a mitochondrií.

Metoda elektroforézy v polyakrylamidové gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti detergentu SDS (**SDS-PAGE**) je založena na schopnosti proteinů vázat dodecylsulfát sodný (SDS) pomocí hydrofobní interakce a rozdílné rychlosti pohybu proteinů v elektrickém poli v závislosti na jejich molekulové hmotnosti. Velké množství navázaného SDS způsobuje, že náboje postranních zbytků aminokyselin jsou zanedbatelné vůči náboji sulfátových skupin, které jsou při biologicky relevantních hodnotách úplně disociované. SDS dává proteinům uniformní náboj, dochází k jejich migraci k anodě, přičemž jejich pohyblivost závisí na velikosti molekuly. Povrchový náboj proteinů v přítomnosti SDS také vede k rozrušení jejich kvartérní struktury, proto lze pozorovat pouze podjednotky složených proteinů. PAGE je provedena v diskontinuálním systému.

Metoda **Western blot** umožňuje převedení separovaných proteinů z gelu na membránu pomocí adsorpčních nebo kovalentních sil. Přenos bývá nejčastěji realizován dvěma způsoby : „semi-dry blotting“, který je využíván pro svou nižší spotřebu přenosových pufrů. Gel je v tomto uspořádání společně s membránou vložen mezi horizontální uhlíkové elektrody. Druhé je uspořádání „tank blotting“ s plně ponořenou membránou a gelem v blotovacím pufru.

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).

Klasický Western blot versus rychlá imunodetekce na přístroji SNAP id.

Příprava vzorku	Elektroforéza	Přenos na membránu	Blokování membrány	Imunochemické reakce	Detekce
45 min – 2 h	0,5 – 1 h	1 – 2,5 h	1 h	3 h	15 min
SNAP i.d. System					
30 min					

Výhody oproti klasické metodě Western blot

- Rychlost
- Kompatibilita se standardními pufrů a blokovacími roztoky
- Zpracování až šesti membrán zároveň
- Možnost recyklace protilátek
- Nízká interference signálu pozadí

Nevýhody

- Nutná optimalizace podmínek před zahájením vlastního experimentu
- Nižší citlivost – nutno použít koncentrovanější roztoky protilátek
- Cena příslušenství

2. Materiál a chemikálie

1) rostlinný materiál : 3 genotypy *Solanum* spp., *Pisum sativum* cv. Audit

2) a) standard Hsp70 z hovězího mozku

- příprava: k 10 µl zamraženého Hsp70 přidat 190 µl "R" roztoku (výsledná koncentrace 0,2 µg/µl), nechat inkubovat 5 min při 100°C a do jamky aplikovat 5 µl (1 µg).

b) standard rekombinantní SIGSNOR

- příprava: k 20 µl rekombinantní GSNOR o koncentraci 0,4 mg/ml přidáme 20 µl vzorkovacího pufru, promícháme, inkubujeme 5 min při 100°C a do jamky aplikujeme 5 µl (1 µg).

3. roztoky pro přípravu gelů:

akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid: 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) ve vodě

pufr do zaostřovacího gelu (stacking gel buffer): 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

pufr do dělicího gelu (running gel buffer): 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

N,N'-tetrametylendiamin (TEMED)

10 % (w/v) persíran amonný (APS) ((NH₄)₂S₂O₈)

- 10% (w/v) SDS
 - vodou nasycený n-butanol
4. Elektrodotový pufr: 0,025 mol.L⁻¹ Tris, 0,192 mol.L⁻¹ glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
 5. Vzorovací pufr: 0,125 M Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% v/v glycerol, 5% merkapt ethanol, 0,02% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8
 6. Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kys. octové
 7. Blotovací pufr: 0,025 mol.L⁻¹ Tris, 0,192 mol.L⁻¹ glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3 (příprava: 3,025 g Tris a 14,41 g glycinu, rozpustíme v 200 ml vody, přidáme 200 ml methanolu, zkontrolujeme pH a doplníme vodou do 1 l, uchovávat při 4°C).
 8. Pracovní pufr pro imunodetekci TBS: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5 (příprava: 4,84 g Tris, 58,44 g NaCl rozpustit v 1 l, upravit pH na 7,5 a doplnit do 2 l vodou)
 9. Tween-20 TBS (příprava: 0,3 ml Tween-20 do 600 ml TBS)
 10. 0,5% nízkotučné mléko v Tween-20 TBS (příprava: 0,5 g sušeného nízkotučného mléka do 100 ml TTBS)
 11. Barvicí roztok s NBT-BCIP: 150 µl komerčního roztoku NBT-BCIP smíchat s 10 ml barvicího pufru
 12. Primární protilátka: monoklonální myši protilátka anti-Hsp70 (ředění 1:500): 6 µl do 3000 µl 0,5% nízkotučného mléka v TTBS: 30 µl do 3000 µl 0,5% nízkotučného mléka v TTBS
 13. Sekundární protilátka: sek. anti-myši Ab značená alkalickou fosfatou (ředění 1:1000): 12 µl do 3000 µl 0,5% nízkotučného mléka v TTBS
 14. Barvicí pufr (staining buffer) : 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,005 M MgCl₂, pH 9,5
 15. Kádinky, teflonová míchadla, automatické pipety, eppendorfy, ledová lázeň, mikrocentrifuga, termoblok, nalévací stojánek, elektroforetická komůrka, skla pro elektroforézu, mezerníky (spacers), hřebínek, stříčka s destilovanou vodou, stříčka s lihem, třepačka, zdroj pro elektroforézu, blotovací aparatura, nůžky, misky pro imunodetekci.

UPOZORNĚNÍ

Akrylamid a N,N'- methylenbisakrylamid jsou neurotoxické látky. S jejich roztokem vždy pracujeme s největší opatrností a v gumových rukavicích.

3. Postup:

3.1. Příprava rostlinného extraktu

a) kvantifikace Hsp70 ve vzorcích rajčete:

Extrakce bude provedena v poměru 1:2 (w:v) v „R“ roztoku. Listy rajčete zvážíme. Zapišeme si jejich hmotnost a vypočítáme si potřebný objem "R" roztoku pro extrakci. Poté provedeme homogenizaci v třecí misce na ledové lázni s přidávkem mořského písku a příslušného objemu "R" roztoku. Extrakt centrifugujeme po dobu 10 minut při 16000 g a teplotě 4 °C. Odebereme supernatant do předem připravených a popsaných eppendorfků. Vzorky inkubujeme 5 minut v termobloku při 100 °C. Do jamek aplikujeme po zchládnutí 15 µl vzorku.

3.2. SDS-PAGE

Malá (bez zářezu) i velká sklička (se zářezem) důkladně odmastíme lihem. Připravíme skla k nalévání gelu : na rovné podložce přiložíme malé skličko na zářezovou stranu velkého sklička, tak, aby mezi nimi vznikl prostor pro gel a umístíme do stojánku pro nalévání gelu. Je třeba zkontrolovat, zda gumové podložky ve stojánku dobře těsní (hrozí vytečení gelu). Mezi skla vložíme hřebínek a na sklo si fixou označíme vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Poté hřebínek odstraníme.

Přichystáme si dvě označené kádinky na přípravu zaostřovacího a dělicího gelu. Podle následující tabulky napipetujeme jednotlivé roztoky (složky gelu) do příslušných kádinek. Rozpis je uveden pro 2 gely a 0,75 mm skla.

Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

gelu	Typ	A	T	T	H	S	T	S
	A/BIS	ris HCl	ris HCl	$_2\text{O}$	DS	EMED	tart 10%	APS
	30%/0,8%	1, 5 mol·l ⁻¹	0, 5 mol·l ⁻¹					
Dělicí 7%	2, 3	2, 5	-	5	,1	0	0, 01	0 ,1
Zaostřovací 4%	0, 65	-	1, 25	3	,05	0	0, 01	0 ,1

Polymerace gelu je vždy zahájena přidavkem roztoku persíranu amonného. Připravený dělicí gel po promíchání (cca 5-10 s) 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 (1 cm pod hřebínek). Gel opatrně převrstvíme *n*-butanolem. Po 15-30 minutách polymerace při laboratorní teplotě odstraníme *n*-butanol pomocí filtračního papíru (nedotýkat se povrchu připraveného gelu) a povrch gelu propláchneme destilovanou vodou a opět vysušíme pomocí filtračního papíru.

Po nastartování polymerizace přidavkem roztoku APS do kádinky, obsahující komponenty pro zaostřovací gel, přeneseme připravenou směs pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla na již zpolymerovaný dělicí gel až po okraj skla. Mezi skla vložíme hřebínek pro vytvoření požadovaného množství jamek. Pod zuby hřebínku se nesmí dostat vzduchové bubliny. Pokud se tak stane, rychle hřebínek vyjmeme a znovu vsuneme. Pozor, roztok se stává silně viskózní během několika minut. Poté necháme gel polymerovat 30 minut.

Skla s připraveným gelem vložíme do elektroforetické komůrky. Fixou si označíme zuby hřebínku. Nalijeme připravený elektrodotový pufr – nejprve do prostoru mezi skly a poté do zbývajících prostorů okolo. Pod elektrodotovým pufrem opatrně vyjmeme hřebínek a pomocí Pasteurovy pipety jamky důkladně propláchneme.

Do jamek aplikujeme připravené vzorky (15 μl) a standard (5 μl) dle uvedeného schématu. Pozor, vzorky neaplikujeme do krajních jamek, dochází zde k deformacím drah seprovaných proteinů.

Elektroforetickou komůrku uzavřeme víkem, vložíme do chladničky a připojíme ke zdroji. Je nutné dbát na správnou orientaci víka a elektrod. Dělení probíhá při konstantním napětí. Na zdroji nastavíme 120 V. Jakmile zóna bromfenolové modři doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu (cca 10 min), nastavíme zdroj na 180 V. Po doputování zóny bromfenolové modři (čelo dělicích se látek) téměř na úroveň dolního okraje skla vypneme zdroj napětí. Odstraníme víko a vylijeme pufr. Pomocí plastové špachtle oddělíme od gelu skla, oddělíme a vyhodíme zaostřovací gel. Odkrojíme levý dolní roh gelu (pro orientaci ve vzorcích při vyhodnocování gelu).

3.3. Tank blotting

Připravíme si blotovací membrány (nitrocelulosová), 4 ks silných filtračních papírů stejné velikosti jako jsou rozměry gelu (8,4 x 4,2 cm). Pozor, nedotýkat se membrány bez rukavic. Membrány, filtrační papíry a porézní houbičky ponoříme na 5 minut do blotovacího pufru. Do blotovací kazety skládáme směrem od černé desky kazety k průsvitné straně kazety následovně jednotlivé vrstvy :

Porézní houbička - filtrační papír - gel - membrána - filtrační papír* - porézní houbička

* je nutné odstranit vzduchové bubliny mezi gelem a membránou pomocí skleněné tyčinky

Kazetu uzavřeme a vložíme do blotovací komůrky. Černá strana kazety směřuje vždy k černé straně blotovací komůrky (katoda (-)). Blotovací komůrku naplníme blotovacím pufrem, uzavřeme víkem (nutno dbát na správnou orientaci elektrod) a vložíme do chladničky (nutné chlazení). Před připojením ke zdroji je nutné vypočítat na základě velikosti membrány proud, který se na zdroji nastaví dle následujícího vzorce :

$$\text{Plocha gelu} \times \text{počet gelů} \times 0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$$

Po 2 hodinách ukončíme blotování. Blotovací pufr slijeme zpět do zásobní lahve a vyjmeme blotovací kazetu. Pro ověření přenosu proteinů na membránu použijeme činidlo Ponceau S. Do misek vložíme membrány a ke každé přidáme 5 ml činidla Ponceau S. Po 5 min inkubaci se na membráně vizualizují přenesené proteiny. Činidlo poté vymyjeme destilovanou vodou.

3.4. Imunodetekce na přístroji SNAP id.

SNAP id. položíme na rovnou plochu pracovního stolu. Připojíme hadici přívodu vakua k zadní části přístroje s použitím plastové spojovací trubičky, která se zaklapne do otvoru v zadní části. Připojíme druhý konec hadice ke zdroji vakua, použijeme 1 l odsávací láhev a filtr pro ochranu zdroje vakua před kapalinami a kontaminací. Při zapojování dbáme na dostatek prostoru pro hadice, aby nedošlo k jejich ohýbání případně zaškrcení. Před zahájením skládání držáku blotu pro dvě membrány si předem připravíme protilátky, blokovací roztok a promývací roztok.

Otevřeme víko držáku blotu, nedotýkáme se bílého vnitřního povrchu. Navlhčíme bílý vnitřní povrch držáku deionizovanou vodou, až změní barvu na šedou. Přebytkovou vodu odstraníme blotovacím válečkem pro zamezení posunů blotovací membrány v držáku. Vložíme navlhčenou membránu na střed komůrky držáku stranou s proteiny směrem dolů. Jemným přejetím válečkem odstraníme veškeré vzduchové bubliny mezi blotovací membránou a povrchem komůrky držáku. Na membránu položíme spacer (není třeba vlhčit) tak, aby kompletně pokrýval celou blokovací membránu a znovu jemným pohybem přejedeme válečkem pro zajištění dokonalého kontaktu spaceru a membrány. Pokud spacer nepokrývá celou plochu blokovací membrány, po vyvolání membrány mohou být pozorovány tmavé čáry v místech polohy okraje spaceru na membráně. Uzavřeme víko držáku blotu a pevně držák zespodu zmáčkneme pro dokonalé uzavření držáku. Otevřeme víko přístroje a vložíme držák do komory přístroje komůrkou směrem vzhůru tak, aby držák zapadl v těle přístroje. Zavřeme víko přístroje.

Do každé komůrky držáku blotu pro jednu membránu nalijeme 30 ml 0,5% roztoku nízkotučného mléka v roztoku Tween-20 v TBS (TTBS) a ihned zapneme přívod vakua otočením přepínače vakua příslušného držáku. (každý přepínač reguluje nezávisle vakuum pro příslušný držák). Při použití systému SNAP id. není nutná inkubace s blokovacím roztokem. Po úplném vyprázdnění komůrky držáku (10-20 sekund) vypneme zdroj vakua otočením přepínače.

Do každé komůrky aplikujeme 3 ml příslušné primární protilátky v 0,5% mléku s TTBS. Roztok protilátky musí rovnoměrně pokrýt celý povrch komůrky! Se zdrojem vakua stále odpojeným provedeme inkubaci s primární protilátkou 10 minut při laboratorní teplotě. Roztok bude absorbován do povrchu držáku blotu a povrch se může jevit zdánlivě jako suchý. Dobu inkubace je možno prodloužit, což ale může vést ke zvýšení signálu pozadí. Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a vyčkáme 10-20 sekund pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky držáku.

Se zdrojem vakua stále připojeným, promyjeme každou komůrku 30 ml promývacího roztoku Tween-20 v TBS. Pro optimální promytí opakujeme nejméně třikrát. Každý promývací krok by měl trvat nejméně 20 s. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua.

Do každé komůrky aplikujeme 3 ml příslušné sekundární protilátky v 0,5% mléku s TTBS. Roztok protilátky musí rovnoměrně pokrýt celý povrch komůrky! Se zdrojem vakua stále odpojeným, inkubujeme s primární protilátkou 10 min při laboratorní teplotě. Roztok bude absorbován do povrchu držáku blotu a povrch se může jevit zdánlivě jako suchý. Dobu inkubace je možno prodloužit, ale může to vést ke zvýšení signálu pozadí. Po uplynutí 10 min zapojíme zdroj vakua a počkáme 10-20 s pro dokonalé odstranění roztoku protilátky z komůrky držáku.

Se zdrojem vakua stále připojeným, promyjeme každou komůrku 30 ml promývacího roztoku TTBS. Pro optimální promytí opakujeme nejméně třikrát. Každý promývací krok by měl trvat nejméně 20 s. Po posledním promývání a úplném odsátí promývací roztoku odpojíme zdroj vakua. Vyjmeme držák blotu z přístroje, položíme na pracovní plochu komůrkou dolů a otevřeme víko držáku. Pinzetou opatrně odstraníme spacer. Vyjmeme membránu a pokračujeme v postupu vizualizace proteinů. Držák blotu recyklujeme do odpadu pro plasty a vyčistíme přístroj propláchnutím deionizovanou vodou.

Pro detekci barevného produktu použijeme chromogenní substrát NBT-BCIP (nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem) pro sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatase. Připravíme si 10 ml barvicího roztoku : 150 µl komerčního roztoku NBT-BCIP smícháme s 10 ml barvicího pufru. Inkubujeme maximálně 10 minut do vyvinutí tmavě fialového zbarvení. Membránu vyfotíme a vyhodnotíme v dokumentačním systému Biospectrum 410 vybaveným citlivou chlazenou CCD kamerou a napojeným na počítač s programem VisionWorks pro sběr a analýzu získaných obrazových dat.

4. Vyhodnocení:

- a) Membránu s detekovanými proteiny vyfotíme v dokumentačním systému Biospectrum 410.
- b) Podle pokynů vyučujícího provedeme denzitometrickou analýzu a kvantifikaci proteinů ve vzorcích. Výsledky přehledně uvedeme do tabulky a grafu.

5.) Kontrolní otázky:

1. Jaké jsou fyziologické funkce Hsp proteinů a enzymu GSNOR v živých organismech?

21. HISTOCHEMICKÁ DETEKCE DEHYDROGENAS

1. Teoretický úvod:

Enzymová histochemie (též nazývaná katalytická histochemie) je metoda sloužící k detekci aktivity enzymů v buňkách nebo tkáních/pletivech organismu. V současnosti je *in situ* prokázáno okolo 150 enzymů, tj. asi 1/10 z celkového počtu enzymů. Samotný princip katalytické aktivity spočívá ve dvou krocích. První krok je samotná "histochemická reakce": tkáň s enzymem + substrát = produkt. Druhý krok je "reakce vizualizace": z testovaného produktu první reakce vznikne barevná a nerozpustná sloučenina. Aby proběhly obě tyto výše uvedené reakce, musí být dodrženy určité podmínky: *zachování aktivity enzymů, zachování struktury buněk a tkání/pletiv - kryostatové řezy (chemická fixace téměř vždy snižuje aktivitu enzymu), pH prostředí, substrát v nadbytku.*

Tyto optimální podmínky zajistíme pomocí *inkubačního prostředí*, které má tyto složky:

- A. **Substrát:** měl by být rozpustný ve vodě při pH optimálním pro daný enzym a měl by mít schopnost vytvářet barevný finální produkt a zároveň dostatečně rychle pronikat do míst fyziologické lokalizace enzymu. Pokud je produkt reakce bezbarvý, přidává se činidlo sloužící k jeho zviditelnění.
- B. **Aktivátor:** látka zvyšující aktivitu enzymu
- C. **Inhibitor:** látka snižující aktivitu enzymu
- D. **Vhodný pufr:** zajistí potřebné pH optimum

Vybrané enzymy a substráty vhodné pro jejich lokalizaci:

Dehydrogenasy	Oxidovatelný substrát odštěpující vodík
Peroxidasy	Peroxid vodíku
Esterasy	Hydrolyzovatelný ester
Glykosidasy	Glykosidická vazba (cukry, glykoproteiny, glykolipidy)
Sulfatasy	Sulfoestery

Následuje zviditelnění reakčního produktu reakcí s chromogenem – **vizualizační reakce:**

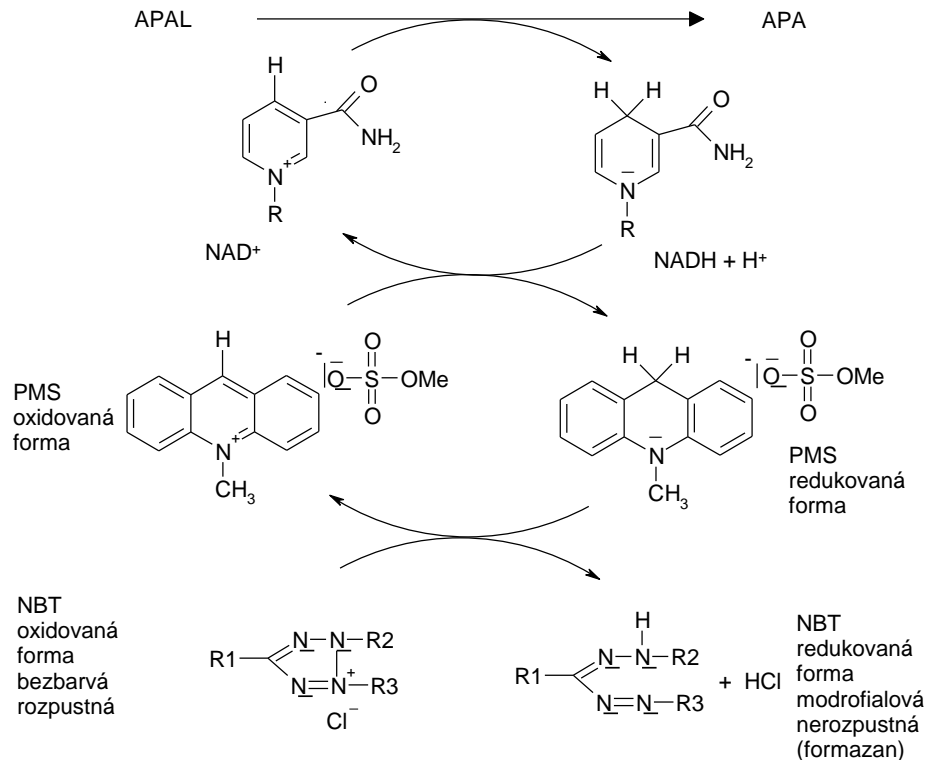
Precipitace s kationty kovů	Vznik barevné nerozpustné soli Pb, Co
Simultánní azokopulace	Produkt (naftol) se převede na azobarvivo
Indigogenní reakce	Štěpení na indoxyl a jeho oxidace na indigo
Tetrazoliová metoda	Redukce tetrazoliové soli na barevný formazan
Peroxidasová reakce	Oxidace DAB (diaminobenzidin)

Detekce se provádí na volných řezech (na hodinovém sklíčku nebo v malých Petriho miskách v inkubačním roztoku), dále na řezech adhezí přilepených na podložní sklíčko nebo na celých rostlinách. Výhodou metod prováděných na celé rostlině je možnost určit prostorovou a časovou distribuci biomolekul v jednotlivých buňkách neporušeného organismu, jde tedy o rychlou a levnou analýzu. Inkubace je provedena většinou při laboratorní teplotě, není-li známá přesnější specifikace podmínek. Totéž platí i o její délce – řádově se pohybuje v rozmezí několika minut až hodin a je závislá na množství enzymu v tkáni a citlivosti dané metody. Řezy mohou být připraveny čerstvé, kryostatované z nefixované tkáně, dále pak z fixovaných vzorků a nebo mohou být připraveny lyofilizací.

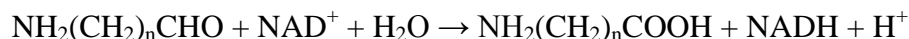
Každý histochemický experiment je nutné doplnit o **kontrolní pokus a inhibiční test(y)**. Kontrolní pokus slouží k verifikaci výsledků a provádí se jednoduše tak, že se v inkubačním médiu vynechá substrát. Inhibiční testy jsou indikovány v těch případech, kdy

stejný substrát je atakován několika enzymy současně. Výsledek katalytické histochemie může být znehodnocen právě přidáním substrátu do kontrolního řezu, nevhodně zvoleným pH při přípravě preparátu nebo difúzí reakčního produktu přes buněčné membrány.

V této úloze se budeme zabývat histochemickou lokalizací dehydrogenas – konkrétně aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH) a S-nitrosoglutathionreduktasy (alkoholdehydrogenasa třídy III). Jedná se o enzymy, které katalyzují oxidaci substrátu odnětím vodíku, jehož akceptorem je NAD^+ . Následující schéma znázorňuje princip detekce aktivity aminoaldehyddehydrogenasy (AMADH):



Nitrotetrazoliová modř (NBT) je ve své oxidované formě bezbarvá a nerozpustná látka, redukcí za přítomnosti fenazinmethosulfátu (PMS) se přemění na modrý nerozpustný formazan. Aminoaldehyddehydrogenasa (AMADH, EC 1.2.1.19) je NAD(P) -dependentní enzym, podílející se v živých systémech na procesu degradace biogenních aminoaldehydů, vznikajících při oxidační deaminaci polyaminů. Touto reakcí tak dochází k oxidaci ω -aminoaldehydů na příslušné ω -aminokyseliny za současné redukce koenzymu NAD^+ , dle rovnice:



AMADH je zařazena do rozsáhlé rodiny aldehyddehydrogenas 9 (ALDH9) náležejících do nadrodiny aldehyddehydrogenas (ALDH). Skupinu ALDH9 vzájemně propojují tři nesouvisející metabolické dráhy, jsou to: metabolismus polyaminů, cholinu a lysinu. Klasifikace jednotlivých členů ALDH9 je tedy vztažena k substrátové specifičnosti, na základě které je dále rozděluje na:

- 4-aminobutyraldehyddehydrogenasy (ABALDH, EC 1.2.1.19)
- 4-guanidinobutyraldehyddehydrogenasy (GBALDH, EC 1.2.1.54)
- betainaldehyddehydrogenasy (BADH, EC 1.2.1.8)
- 4-trimethylaminobutyraldehyddehydrogenasy (TMABALDH, EC 1.2.1.47)

Mezi typické substráty tak můžeme zařadit 4-aminobutyraldehyd (ABAL), 3-aminopropionaldehyd (APAL), 4-guanidinobutyraldehyd (GBAL), betainaldehyd (BAL), *N,N,N*-trimethyl-4-aminobutyraldehyd (TMABAL) a dále několik aromatických a alifatických aldehydů. Rozsah substrátové specifčnosti daného enzymu, který byl izolován z různých organismů, není vždy striktně vymezen, proto by výše uvedené enzymy měly být obecněji považovány za AMADH.

Aktivita AMADH byla poprvé vizualizovaná v etiolovalých semenáčcích hrachu. Nejintenzivnější zbarvení, a tedy i nejvyšší aktivita AMADH byla detekována v buňkách pericyklu a endodermis kořene a hypokotylu. Slabší zbarvení bylo pozorováno ve vaskulárním kambiu kořene. V případě epikotylu a vrcholku výhonu byla činnost AMADH prokázána zejména ve vaskulárním kambiu, dále pak v pericyklu a endodermis, kde již intenzita vybarvení byla nižší. Aktivita AMADH byla také studována v reakci na stres, konkrétně na mechanické poškození, které vyvolalo zvýšení aktivity enzymů účastnících se degradační dráhy polyaminů (jako jsou peroxidasy, aminooxidasy a aminoaldehyddehydrogenasy), paralelně s nárůstem putrescinu, kadaverinu, spermidinu a 4-aminomáselné kyseliny. Zvýšená aktivita AMADH byla histochemicky lokalizovaná na řezech semenáčků hrachu, konkrétně v epidermálních buňkách a buňkách kortikálního parenchymu, jež přiléhaly k místu poškození - byla zde patrná i intenzivní lignifikace.

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je enzym náležející do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1). Ve starší literatuře se setkáme s označením glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1). Po odhalení reakčního mechanismu, kterým je NAD^+ -dependentní oxidace aduktu formaldehydu a glutathionu S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS) byl název enzymu od roku 2005 změněn na S-(hydroxymethyl)-glutathiondehydrogenasu (EC 1.1.1.284). Katalýza NAD^+ -dependentní oxidace S-HMGS představuje klíčový krok detoxifikace exogenního i endogenního formaldehydu. Ovšem z fyziologického hlediska se za podstatnější považuje role GSNOR v katabolismu nejvýznamnějšího nízkomolekulárního S-nitrosothiolu S-nitrosoglutathionu (GSNO) na oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH_3). I přes vysokou specifčnost pro GSNO byla potvrzena role enzymu v nepřímé kontrole intracelulární hladiny proteinových S-nitrosothiolů u *Arabidopsis thaliana*. Podobně jako u živočichů se i u rostlin předpokládá role GSNOR v ochraně proti nitrosačnímu stresu, a to udržováním homeostázy oxidu dusnatého (NO) a reaktivních forem dusíku (RNS) uvnitř buněk. Aktuální vědecké práce popisují významnou funkci enzymu v obranných reakcích na abiotické a biotické stresové faktory.

Kolorimetrická metoda pro detekci aktivity GSNOR byla již popsána *in situ* v elektroforetických gelech. Je založena na skutečnosti, že oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu enzymem GSNOR způsobí redukci NAD^+ na NADH, což dále vede k redukci nitrotetrazoliové modři na nerozpustný formazan. Tato metoda byla později přizpůsobena histochemické detekci GSNOR v živočišných tkáních. Barvení nitrotetrazoliovou modří bylo dříve používáno v cytochemických testech pro měření respirační aktivity v kořenech. V roce 2004 byla popsána nová metoda pro rychlou detekci aktivity GSNOR v celé rostlině. Jedná se o kombinaci metody pro detekci GSNOR v elektroforetických gelech spolu s histochemickou lokalizací β -glukuronidasy v semenáčcích *A. thaliana*. 3-denní rostliny vykazovaly vysokou aktivitu GSNOR v kořeni, u 16-denních rostlin byla vysoká aktivita také v kořeni, ale i v listech s výjimkou řapíku. Jako kontrolní vzorky byly použity semenáčky inkubované ve směsi obsahující pouze formaldehyd (bez glutathionu) a semenáčky inkubované ve směsi obsahující pouze glutathion (bez formaldehydu). Na těchto kontrolních vzorcích byla detekována oxidace formaldehydu, případně glutathionu jinými enzymatickými systémy jako jsou mitochondriální aldehyddehydrogenasy nebo glutathionreduktasy, projevuje se zde také endogenní přítomnost

glutathionu a formaldehydu v buňkách rostliny. Metoda může být aplikována na studium změn aktivity GSNOR v důsledku odpovědi na abiotické a biotické stresové faktory.

2. Materiál a chemikálie

2.1. Zásobní roztoky :

4% agarosa (příprava: 2 g do 50 ml vody, rozvařit)

Pufř pro detekci AMADH - 0,15 M Tris-HCl, pH 8,5

Pufř pro detekci GSNOR: 100 mM fosforečnan sodný, pH=7,5, obsahující 0,1% Triton X-100 (pipetovat 100 μ l na 100 ml pufřu)

Před experimentem je nutné připravit čerstvou reakční směs:

a) detekce AMADH (na 10 ml pufřu):

- 1 mM APAL: rozpis na 100 mM APAL: 16,2 μ l 1-amino-3,3-diethoxypropan + 983,8 μ l 0,4 M HCl – do termobloku 10 min při 100°C. Do reakční směsi přidáme 100 μ l 100 mM APAL.

- 1 mM NAD⁺: navážka 6,634 mg

- 0,15 mM PMS: navážka 0,459 mg

- 0,75 mM NBT: navážka 6,132 mg

b) detekce GSNOR (na 10 ml pufřu):

- 9 mM pyruvát sodný: navážka 10 mg

- 65,3 μ M PMS: navážka 0,2 mg

- 24,5 μ M NBT: navážka 0,2 mg

Připravit čerstvé a nepřidává se do reakční směsi:

- 60 mM NAD⁺: 4 mg navážky rozpustit ve 100 μ l destilované vody

- 500 mM formaldehyd: 5 μ l konc. formaldehydu přidat do 100 μ l destilované vody

- 100 mM glutathion: 1,7 mg navážky rozpustit ve 100 μ l destilované vody

Příprava čerstvého formaldehydu z paraformaldehydu:

- 3 g paraformaldehydu rozpustíme v 10 ml destilované vody, za stálého míchání zahřejeme na 70°C

- přidáme několik kapek 6N NaOH do úplného rozpuštění paraformaldehydu

- poté necháme roztok zchladnout a rozpipetujeme po 1 ml, uchováme zamražené při -20°C

- výsledná koncentrace je 10 M formaldehyd

Extrakční roztok pro kvantifikaci formazanu: 125 μ l 2 M KOH, 125 μ l DMSO

2.2. Rostlinný materiál :

a) AMADH: 7-denní semenáčky *P. sativum* – 24 h před pokusem mechanicky poškodit stonek

b) GSNOR: 9-denní semenáčky *A. thaliana* ekotyp Columbia pěstované na horizontálním agaru – 2 h před experimentem provést inkubaci při 42°C

2.3. Materiál

- ✓ vibratom, žiletka, filtrační papír, štětce, Petriho misky, kultivační misky, skalpel, kapátko, krycí a podložní skla, vteřinové lepidlo, světelný mikroskop

3. Postup

3.1. Postup pro přípravu řezů - detekce AMADH:

1. Zahřejeme 50 ml 4% agarosu v mikrovlnné troubě.
2. Agarosu nalejeme do Petriho misky, po zchladnutí na cca 40°C kolmo vložíme pomocí pinzety 0,5 cm segmenty stonku hrachu, které si připravíme nakrájením žiletkou na skleněné podložce.
3. Po ochlazení agarosu v misce s ledem skalpelem vyřízneme kvádr agarosu 1,5 cm x 1,5 cm se vzorkem stonku uprostřed, ten upravíme do tvaru pyramidy a základnu přilepíme na základní kostku vibratomu.
4. Podle pokynů vyučujícího připravíme 100 μm silné řezy, které pomocí štětečku přeneseme do kapky pufru v Petriho misce.
5. Detekce AMADH: barvení při 25°C 1-3 h ve tmě – kompletní reakční směs obsahující 1 mM APAL, 1 mM NAD⁺, 0,15 mM PMS a 0,75 mM NBT.
6. Jako kontrola budou sloužit řezy inkubované v reakční směsi bez substrátu APAL.

3.2. Postup pro barvení celých rostlin - detekce GSNOR:

1. Čerstvě připravenou reakční směs rozdělíme do 2ml zkumavek podle uvedeného rozpisu.
2. Pinzetou opatrně do zkumavek vložíme semenáčky *A. thaliana*.
3. Poté postupně do zkumavek přidáváme podle rozpisu uvedené složky o finálních koncentracích: 0,6 mM NAD⁺, 5 mM formaldehyd, 1 mM glutathion.
4. Na všechny vzorky aplikujeme vakuum po dobu 10 minut, poté vzorky umístíme do tmy a inkubujeme po dobu 40 minut při 42°C.
5. Po ukončení inkubace vzorky opakovaně proplachujeme 70% ethanolem.

Tab. 1 Rozpis experimentu pro detekci GSNOR:

	Barvení	Kontrola	Kontrola bez NAD ⁺	Kontrola bez GSH	Kontrola bez formaldehydu
Reakční směs	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
60 mM NAD ⁺	20μl	-	-	20μl	20μl
500mM formaldehyd	20μl	-	20μl	20μl	-
100 mM glutathion	20μl	-	20μl	-	20μl

3.3. Kvantifikace formazanu:

Rostlinky po odbarvení ethanolem necháme uschnout v předvážené eppendorfce a poté opatrně vysušíme fěnem. Pro určení suché váhy zvážíme eppendorfky s usušenými rostlinkami. Na 10 mg suché hmotnosti přidáme 250 μl extrakčního roztoku. Extrakci necháme probíhat 10 minut na ultrazvukové lázni. Poté 5 min centrifugujeme při 16000 g a odebereme 200 μl extraktu do jamky mikrotitrační destičky. Změříme absorbanci při 620 nm. Jako blank použijeme 200 μl extrakčního roztoku.

4. Vyhodnocení:

1. Výsledná pozorování dokumentujeme fotografií opatřenou měřítkem a popisem pozorovaného objektu.
2. Do tabulky přehledně uvedeme pozorování po inkubaci řezů/celých rostlin za různých podmínek a zdůvodníme.
3. Sestavíme graf pro kvantifikaci formazanu v kořenech semenáčků *A. thaliana* po vystavení teplotnímu stresu.

5. Kontrolní otázky:

1. Proč je nutné každý histochemický experiment doplňovat o kontrolní vzorky?
2. Popište princip detekce AMADH a GSNOR.