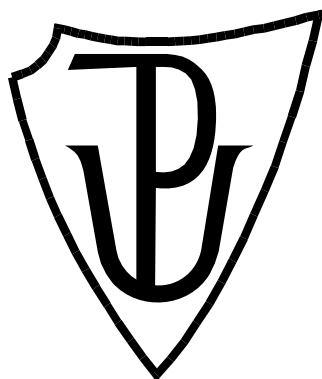


**UNIVERZITA PALACKÉHO
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**



**EXPERIMENTÁLNÍ METODY
STUDIA OBRANNÉ REAKCE
ROSTLIN**

**Marek Petřivalský
a kolektiv**

OLOMOUC 2010

OBSAH

Laboratorní řád.....		
Bezpečnost práce v chemické laboratoři.....		
První pomoc při nehodě.....		
1. Příprava rostlinného materiálu a působení stresových faktorů	5	16
2. Příprava protoplastů	17	24
3. Stanovení životnosti a buněčné smrti	25	33
4. Stanovení reaktivních forem kyslíku	34	40
4.1. Stanovení koncentrace peroxidu vodíku		
5. Stanovení oxidu dusnatého reaktivních forem dusíku.....	41	47
5.1. Griessova metoda stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů	43	
5.2. Stanovení produkce NO oxyhemoglobinovou metodou	44	
6. Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku	48	53
7. Stanovení peroxidace lipidů	54	59
8. Stanovení celkové antioxidační kapacity v rostlinných extraktech	60	62
9. Stanovení aktivity enzymů podílejících se na degradaci aktivních forem kyslíku	63	68
10. Stanovení izoenzymového zastoupení rostlinných peroxidas elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek	69	75
11. Stanovení aktivity fenylalaninamoniaklyasy. Lokalizace produkce fenolických látek ligninu v rostlinném pletivu	76	78
12. Stanovení volných a vázaných fenolů v rostlinných extraktech	79	
13. Stanovení volných a konjugovaných polyaminů	80	84
14. Stanovení nízkomolekulárních a proteinových S-nitrosothiolů v rostlinných extraktech	85	98
Literatura.....	99	
Seznam použitých zkratk.....	104	
Přístrojové vybavení.....	105	

LABORATORNÍ ŘÁD

1. Student je povinen se seznámit před zahájením práce v laboratoři s laboratorním řádem, s bezpečnostními předpisy a s poskytováním první pomoci.
2. Pro získání zápočtu je nutná 100% účast na cvičení. V případě nemoci si lze cvičení nahradit v rámci zápočtového týdne (výjimečné situace se budou řešit individuálně, př. pobyt v nemocnici).
3. Každá absence musí být omluvena. Má-li student vážné osobní důvody, pro které se nemůže zúčastnit cvičení, sdělí to vedoucímu předem. Každá zameškaná úloha musí být nahrazena. Na termínu náhradního cvičení se dohodne posluchač s vedoucím cvičení.
4. Student je povinen přicházet do laboratoře včas.
5. Student musí být na praktické cvičení teoreticky připravený. Před zahájením cvičení vyučující ověřuje znalosti studentů. Pokud student nemá dostatečné znalosti k řešení dané úlohy, cvičení vykoná v náhradním termínu. Maximální počet náhradních cvičení je 2.
6. Při práci v laboratoři musí mít student pracovní plášť a přezůvky.
7. Studenti pracují ve dvojicích. Před zahájením práce zkontrolují podle příloženého seznamu pracovní stůl, na případné nesrovnalosti upozorní vyučujícího.
8. Při práci je nutné postupovat přesně podle zadané úlohy a pokynů vyučujícího. Před používáním přístrojů se musí student nejprve seznámit s jejich obsluhou.
9. Průběh práce a dosažené výsledky si každý student zaznamenává do protokolárního sešitu. Po skončení cvičení předloží výsledky k ověření vedoucímu cvičení.
10. Následující cvičení dvojice studentů, řešící spolu danou úlohu, odevzdá jeden společný protokol, který musí obsahovat: jména studentů, studijní kombinaci, datum, název úlohy, stručný princip úlohy, stručný pracovní postup, výsledky, diskusi, závěr (tabulky, grafy) a odpovědi na otázky uvedené u každé úlohy.
11. Po skončení práce je student povinen dát své pracovní místo do pořádku, řádně umýt sklo a opláchnout jej destilovanou vodou.
12. Student smí opustit laboratoř až po kontrole dosažených výsledků a stavu pracovního stolu vyučujícím.
13. V laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit.
14. Studenti jsou povinni dodržovat bezpečnostní předpisy.
15. Práce s jedovatými těkavými a páchnoucími látkami se provádí pouze v digestoři.
16. Zvláštní opatrnosti je třeba dbát při manipulaci s otevřeným ohněm, hořlavinami, žíraviny a jedovatými látkami.
17. Případné závady, nedostatky, nehody nebo poranění je nutné ihned hlásit vyučujícímu a v případě potřeby poskytnout okamžitě první pomoc.

BEZPEČNOST PRÁCE V CHEMICKÉ LABORATOŘI

Všichni studenti musí být před zahájením cvičení seznámeni a přezkoušeni ze zákona č. 356/2003 Sb. V chemické laboratoři může dojít k poranění při práci se sklem, při neopatrné manipulaci s elektrickými přístroji a zejména při práci s chemikáliemi. Aby nedocházelo k poškození zdraví, je nutné dodržovat základní zásady bezpečnosti práce:

1. Provádíme pouze práce podle pokynů vyučujícího.
2. Seznámíme se s rozmístěním hasících přístrojů a s únikovými východy z laboratoře.
3. V laboratoři nikdy nejíme, nepijeme a nekouříme. K jídlu a pití nikdy nepoužíváme chemické sklo.
4. Po skončení práce si důkladně umyjeme ruce.
5. Tašky a oblečení uložíme na vyhrazené místo mimo laboratoř.
6. Při práci v laboratoři vždy nosíme pracovní plášť a vhodnou obuv.
7. Neprovádíme samovolné opravy nebo úpravy na elektrické instalaci a přístrojích.
8. Chemikálie nikdy nezkoušíme ústy a neinhaluujeme výpary.
9. Nepipetujeme ústy!
10. Při práci se žíravinami a jinými nebezpečnými látkami si chráníme obličej a oči ochranným štítem, ruce gumovými rukavicemi.
11. Na pracovišti udržujeme pořádek a čistotu. Dbáme, abychom vnější stěny nádob nebo pracovní místo nepotřísnili chemikáliemi.
12. Koncentrované kyseliny a zásady ředíme tak, že kyselinu nebo zásadu lijeme tenkým proudem po tyčince do vody za současného míchání a chlazení.
13. Při provádění pokusů ve zkumavkách držíme ústí zkumavek odvrácené od obličeje (svého i spolupracovníků).
14. Při práci s hořlavinami nesmí být v blízkosti otevřený oheň.
15. Zbytky jedů likvidujeme podle pokynů vyučujícího.
16. Při práci s étherem dbáme úzkostlivě na bezpečnostní opatření (možnost vznícení i od horkých součástí).
17. V případě nehody okamžitě informujeme vyučujícího a poskytneme první pomoc.
18. Po skončení práce uzavřeme vodu a vypneme elektrické spotřebiče.

PRVNÍ POMOC PŘI NEHODĚ

1. Při poleptání kůže silnou zásadou nebo kyselinou zasažené místo ihned důkladně omyjeme proudem vody. Při poleptání kyselinou provedeme neutralizaci roztokem hydrogenuhličitanu sodného (20 g/l), při poleptání zásadou zředěnou kyselinou octovou (5 g/l).
2. Při zasažení oka chemikálií ihned oko vypláchneme slabým proudem vody. V případě zasažení zásadou oko vypláchneme borovou vodou (roztok kyseliny borité 30 g/l), jedná-li se o kyselinu použijeme k výplachu roztok boraxu (20 g/l). V každém případě je nutné vyhledat odborné vyšetření u očního lékaře.
3. Při poleptání sliznice v ústech provedeme důkladný výplach úst vodou a následně neutralizaci výplachem kyselinou octovou (poleptání zásadou) nebo hydrogenuhličitanem sodným (poleptání kyselinou).
4. Při požití
 - louhu se doporučuje pít zředěnou kyselinu octovou (0,5-2,0 g/l),
 - kyseliny pijeme suspenzi oxidu hořečnatého nebo hydroxidu hlinitého ve vodě,
 - jedů je charakter první pomoci specifický podle druhu otravy, doporučuje se vypít spoň 0,5 l vody a vyvolat zvracení,
 - chemikálií je nutné vyhledat odborné lékařské ošetření.
5. V případě vzplanutí hořlavých látek okamžitě vypneme elektrický proud a odstraníme všechny hořlavé látky z blízkosti požáru. Hořící oděv hasíme příkrývkou nebo sprchovou vodou. Při likvidaci větších plamenů použijeme hasící přístroje. Při malých popáleninách ošetříme postižené místo mastí na spáleniny a zakryjeme sterilním obvazem. Větší popáleniny ošetří lékař.
6. Při pořezání sklem odstraníme z povrchové rány sklo, okolí oťreme zředěným peroxidem vodíku (0,9 mol/l) a ovážeme sterilním obvazem. Větší zranění ošetří lékař.

1. PŘÍPRAVA ROSTLINNÉHO MATERIÁLU A PŮSOBENÍ STRESOVÝCH FAKTORŮ

1A. Příprava rostlinného materiálu

1.1 Teoretický úvod

Charakteristika rodu *Cucumis*

Rod *Cucumis* patří do čeledi *Cucurbitaceae* (tykvovité), která je velmi různorodá jak z hlediska taxonomického, tak i genetického. V této čeledi je 118 rodů a 825 druhů. Rod *Cucumis* je geneticky rozmanitý, nejčastěji se vyskytuje v tropických a subtropických oblastech (Lebeda & Křístková, 1993). Jedná se o významné plodiny v zemědělství mírného pásu. Mezi důležité zemědělské zástupce patří *C. sativus* L. (okurka setá), *C. melo* L. (meloun cukrový), *C. metuliferus* (metulony, kiwano) (Křístková et al., 2003).

Rod *Cucumis* zahrnuje asi 30 druhů. *C. sativus* (okurka setá, obr. 1) pochází pravděpodobně z indického podhůří Himalájí. Tento druh tvoří izolovanou a kompaktní skupinu. *C. sativus* je charakterizován relativně omezenou genetickou diverzitou. *C. sativus*, *C. hardwickii* a *C. callosus* mají diploidní počet chromozómů $2n=14$. U všech ostatních druhů rodu *Cucumis* se počet chromozómů pohybuje v násobku 12, a to v rozmezí 24 až 72 (Křístková & Lebeda, 1995). *C. sativus* je nejrozšířenější kultivovaná rostlina z čeledi *Cucurbitaceae*. Pěstuje se pro plody, které se používají jako zelenina.

Mezi nejvýznamnější abiotické faktory ovlivňující rod *Cucumis* náleží zejména nízká teplota, vysoká zasolenost půdy, půdní kyselost a vysoká půdní vlhkost (Křístková et al., 2003).



Obr. 1 *Cucumis sativus* (okurka setá).

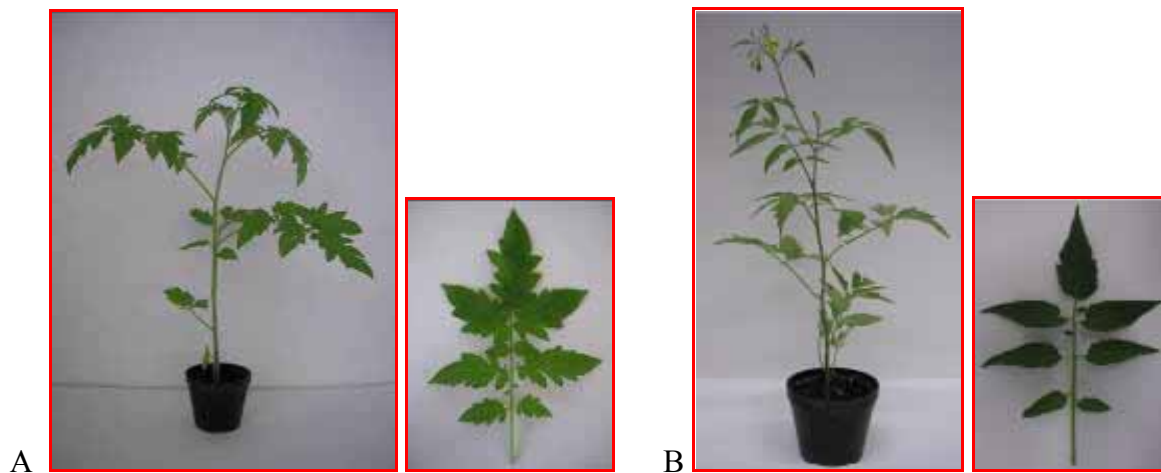
Charakteristika rodu *Lycopersicon*

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

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

Peruvianum-komplex se sestává ze dvou zelenoplodých druhů (*L. peruvianum* a *L. chilense*). Avšak právě tyto dva druhy, které jsou nositeli významných vlastností, se vyznačují problematickou sexuální křížitelností s *L. esculentum*. 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 dva genotypy *Lycopersicon* spp.: *L. esculentum* cv. Amateur - vysoce náchylný a *L. chmielewskii* (LA 2663) - středně rezistentní (obr. 2).



Obr. 2 *Lycopersicon esculentum* (A), *Lycopersicon chmielewskii* (B).

Charakteristika rodu *Pisum*

Rod *Pisum* tvoří mnoho morfologicky odlišných typů rozšířených po celém světě. Hrách (*Pisum*) řadíme do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Hospodářsky nejvýznamnějším druhem je hrách setý (*Pisum sativum*) (obr. 3) patřící mezi nejrozšířenější druhy luskovin. Pěstuje se v celém mírném pásmu převážně jako jarní plodina. Semena hrachu mají vysoký obsah bílkovin, který je asi 2x vyšší než u obilovin. Skladba aminokyselin je rovněž příznivější než u obilovin, neboť má více nepostradatelných aminokyselin, vyšší obsah vitamínů a minerálních látek. Semena hrachu jsou důležitým zdrojem bílkovin pro výživu lidí i zvířat (<http://www.agromanual.cz>). Největším kladem je fixace vzdušného dusíku symbiotickými bakteriemi a jeho exkrece do půdy.



Obr. 3 *Pisum sativum* (hrách setý).

Existuje několik publikací používajících hrách setý jakožto modelovou rostlinu při studiu vlivu salinitního stresu na růst rostlin a jejich klíčení (Okçu et al., 2005), na indukcii rostlinných hormonů (Atanassova et al., 1996; Atanassova et al., 1997; Zdunek-Zastocka et al., 2004) a antioxidačních enzymů (Gómez et al., 2004; Hernández et al., 1995; Hernández et al., 1999; Hernández et al., 2000; Hernández et al., 2001) a na produkci stresových proteinů (Kav N. et al., 2004), reaktivních forem kyslíku (Hernández et al., 2001) a NO (Kolbert et al., 2005).

1.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

3% roztok Sava, 8% roztok chloraminu B, 70% ethanol, 1 M KOH, alar, benzylaminopurin (BAP), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, FeEDTA, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, fytoagar, H_3BO_3 , IBA, KH_2PO_4 , KCl, KI, KNO_3 , kyselina askorbová, manitol, MES, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, MS médium, NaCl, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, sacharosa, sterilní destilovaná voda, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Materiál:

Alobal, Erlenmayerovy baňky, filtrační papír, kádinky, kultivační plastové boxy, květináče, lžičky, míchadla, nůžky, odměrné válce, páska na autoklávování, perlit, pinzeta, pipety, plastové kelímky, plastové zkumavky, Petriho misky, rašelina, váženky, zahradnický substrát, zásobní lahve.

Rostlinný materiál:

Semena *C. sativus* cv. Marketer, *C. sativus* L. STELA F1, *C. melo* L. (PI 313970), *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii* (LA 2663), *L. esculentum* Mill. a mutanta 7B-1, *P. sativum* cv. Lantra a cv. Lincoln.

Přístroje:

Akvarijní motorek, analytické váhy, autokláv, flow-box, fytotron, chladicí box, elektromagnetická míchačka, předvážky, pH metr, termostat, vařič.

1.3. Pracovní postup

1.3.1. Pěstování rostlin ve skleníku (fytotronu)

1.3.1.1. Pěstování rostlin rodu *Cucumis*

Vhodné genotypy rodu *Cucumis* pro experimenty zaměřené na studium vlivu biotického stresového faktoru (infekce patogenem *Golovinomyces cichoracearum* (Gc., syn. *Erysiphe cichoracearum*) rasa 51/01): *C. sativus* L. STELA F1, *C. melo* L. (PI 313970).

1. Semena rostlin vysejeme do perlitu.
2. Dvoutýdenní semenáčky přesadíme do květináčů se zahradnickým substrátem (objem 3 l).
3. Rostliny pěstujeme ve fytotronu při fotoperiodě 14/10 h (den/noc) a teplotě 26/18 °C (den/noc) po dobu 7-8 týdnů.

4.3.1.2. Pěstování rostlin rodu *Lycopersicon*

Vhodné genotypy rodu *Lycopersicon* pro experimenty zaměřené na studium vlivu biotického stresového faktoru (infekce patogenem *Oidium neolyopersici*): *L. esculentum* cv. Amateur - vysoce náchylný a *L. chmielewskii* (LA 2663) - středně rezistentní.

1. Semena vysejeme do plastových kelímků s perlitem o průměru 7 cm.
2. Sazenice s plně vyvinutými děložními listy přemístíme do plastových kelímků o průměru 7 cm obsahujících zahradní zeminu/rašelinu v poměru 2:1 (v:v).
3. Rostliny pěstujeme ve fytotronu při konstantní teplotě 20 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc). Pro vlastní experiment použijeme rostliny ve stáří cca 8-10 týdnů.

1.3.2. Pěstování rostlin za sterilních podmínek

1.3.2.1. Příprava rostlin pro izolaci protoplastů

Vhodné genotypy rodu *Cucumis*: *C. sativus* cv. Marketer; rodu *Lycopersicon*: *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii* (LA 2663).

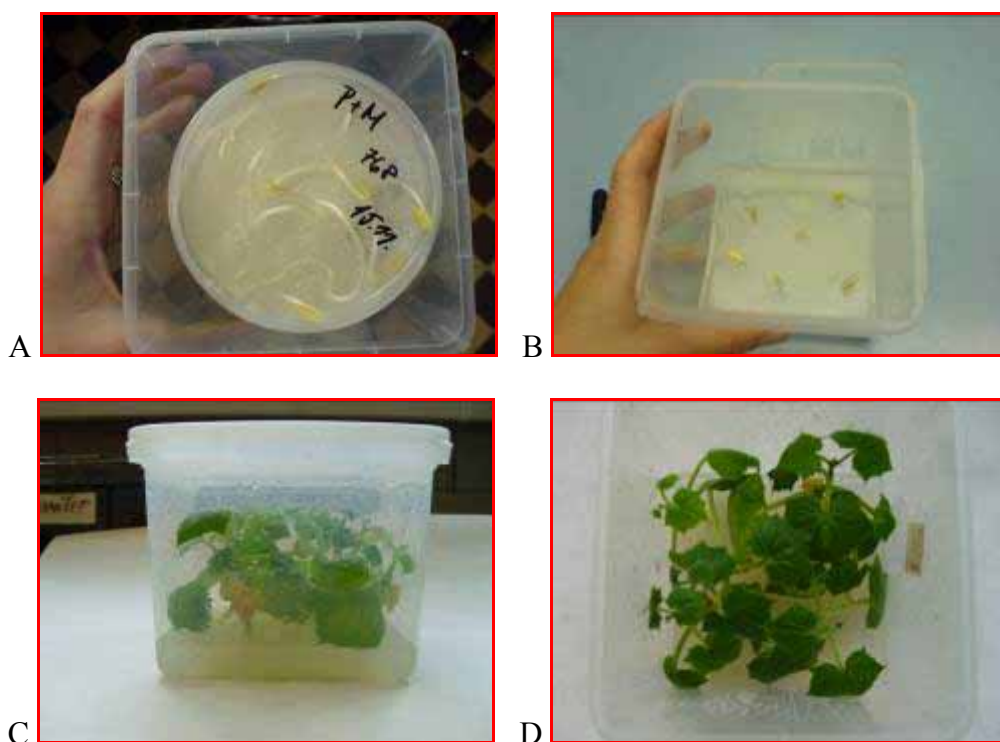
1. Nepoškozená semena krátce povrchově sterilizujeme 70% ethanolem a následně aplikací 8% roztoku chloraminu B po dobu 25-30 min.
2. Po sterilizaci semena ve flow-boxu 3x opláchneme sterilní destilovanou vodou a přeneseme po 6 kusech na sterilní vlhký filtrační papír v Petriho misce o průměru 9 cm. Klíčení probíhá ve tmě při 25 °C.
3. Po 5 až 7 dnech od výsevu zbavíme naklíčené rostliny kořínků a vysadíme je po 6 kusech do kultivačních plastových boxů obsahujících 100 ml média OK (MS médium + alar, doplněné růstovými regulátory a kyselinou askorbovou, tab. 1 a 2, obr. 4). Kultivace probíhá 3-4 týdny v kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a světelným režimem 16/8 h (den/noc).

Tab. 1 Složení MS média (Murashige & Skoog, 1962).

Složení	Množství [mg/l]
NH ₄ NO ₃	1650
H ₃ BO ₃	6,2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025
KH ₂ PO ₄	170
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
KNO ₃	1900
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,6

Tab. 2 Složení OK média (modifikováno podle Gajdová et al., 2007).

Složení	Množství [g/l]
MS médium	
IBA	0,00001
BAP	0,00001
Sacharosa	20
Alar	0,01
Kyselina askorbová	0,02
Agar	8

**Obr. 4 Výsev, klíčení (A) a kultivace rostlin *C. sativus* za sterilních podmínek (B-D).**

1.3.2.2. Příprava rostlin pro studium vlivu abiotických stresových faktorů

Vhodné genotypy rodu *Lycopersicon* pro experimenty zaměřené na studium vlivu abiotického stresového faktoru (salinitní a osmotický stres): *L. esculentum* Mill. a mutant 7B-1.

1. Připravíme si médium pro vysetí semen dle tab. 3.
2. pH tohoto roztoku upravíme 1 M KOH na hodnotu 6,1.
3. Do každé zásobní lahve navážíme 2,8 g fytoagaru, ke kterému poté přidáme 400 ml výše zmíněného roztoku.

4. Lahve s agarem ihned autokládujeme.
5. Vyautokládovaný agar uchováváme v chladicím boxu.
6. Semena ošetříme před umístěním na agar 3% roztokem Sava po dobu 20 min pro zajištění sterility.
7. Ve sterilním prostředí flow-boxu semena 10x propláchneme sterilní destilovanou vodou a následně přenášíme pomocí pinzety na Petriho misky s agarem (20 ml agar/miska).
8. Misky se semeny zabalíme do alobalu a přeneseme do pěstebního boxu.
9. Semena rajčete (*L. esculentum* Mill.) necháme naklíčit 3 dny (mutant *7B-1*) nebo 4 dny (WT) ve tmě v pěstebním boxu při 25 °C na základním agaru.
10. Naklíčená semena přeneseme opět za přísně sterilních podmínek na dva typy agarů: a) agary obsahující manitol o koncentraci 0, 100, 120, 150 mM, b) agary obsahující NaCl o koncentraci 0, 20, 40, 60, 80, 100 mM. Tyto agary obsahující stresový faktor připravíme stejným postupem jako základní agar s výjimkou přídatku příslušné navážky manitolu či NaCl.
11. Rostliny obou genotypů pěstujeme 7 dnů v pěstebním boxu ve tmě při 25 °C nebo pod modrým světlem při fotoperiodě 24/0 h (den/noc) při 23 °C. „Sklízíme“ pouze nadzemní části rostlin.

Tab. 3 Složení základního média.

Složení	Množství [g/l]
MS médium	4,3
sacharosa	10
MES	0,1952

1.3.3. Příprava rostlin pro studium vlivu abiotických stresových faktorů

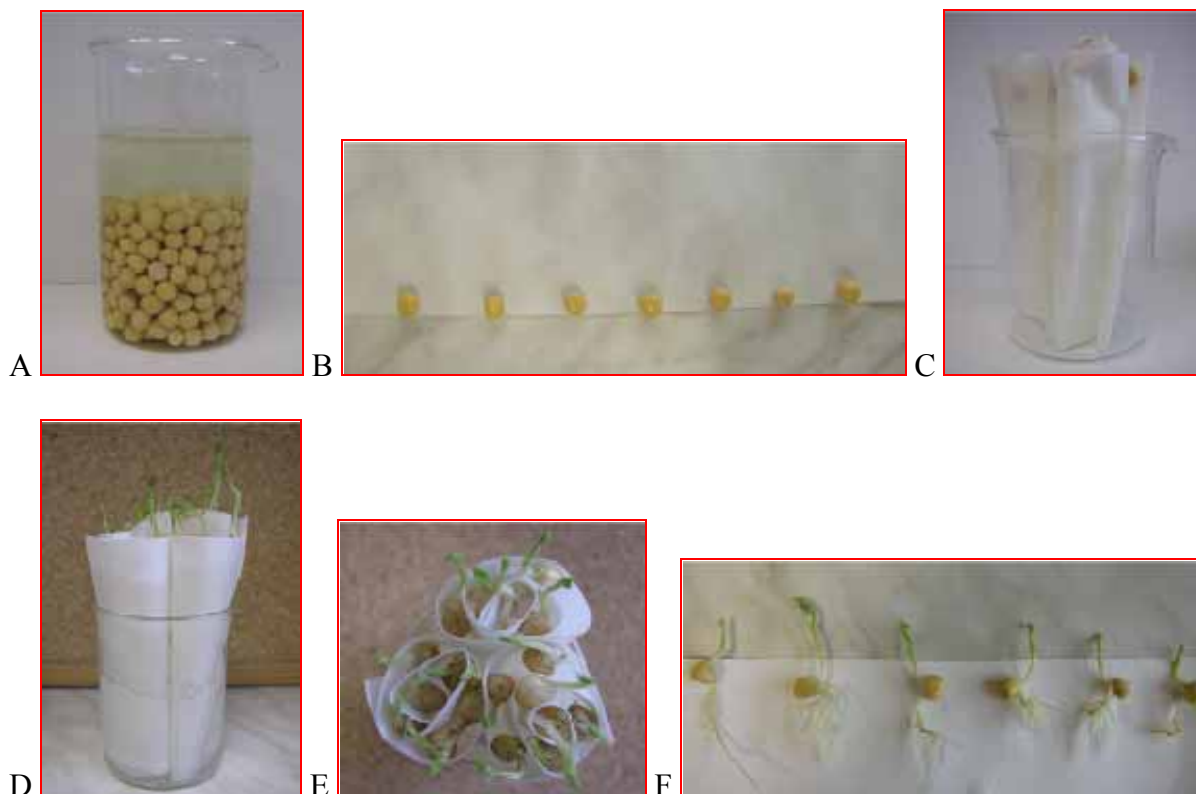
Vhodné genotypy rodu *Pisum* pro experimenty zaměřené na studium vlivu abiotického stresového faktoru (salinitní a osmotický stres, vliv toxických kovů): *P. sativum* cv. Lantra a cv. Lincoln.

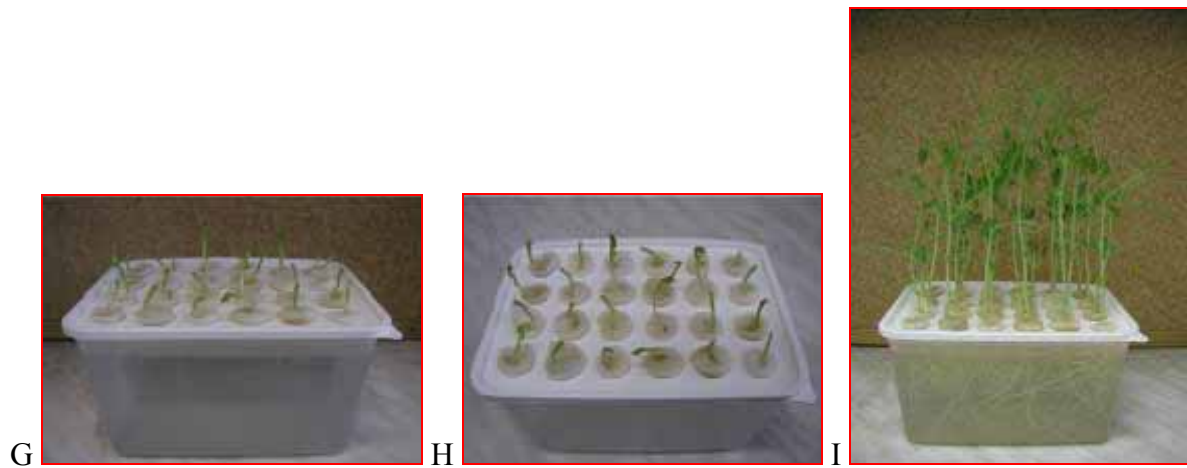
1. Nabobtnaná semena hrachu setého (*P. sativum* cv. Lantra a cv. Lincoln) narolujeme do filtračního papíru, který umístíme do kádinky s vodou (obr. 5).
2. Semena takto necháme 6 dní klíčit v termostatu.
3. Klíčící rostliny přemístíme do pěstebních boxů se zavedeným provzdušňováním a obsahujících Hoaglandův roztok (tab. 4), který si připravíme následujícím způsobem:
 - a) Připravíme si 7 lahví pro přípravu zásobních roztoků dle tab. 4 (KCl, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ připravíme do 1 zásobní lahve).
 - b) FeEDTA připravíme následovně. V 800 ml vody rozpustíme 7,44 g Na_2EDTA a 5,56 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Roztok zahřejeme na teplotu 60 °C po dobu 1 h, poté jej necháme schladnout a doplníme na objem 1 l. Připravený FeEDTA skladujeme v chladicím boxu.
4. Rostliny pěstujeme ve fytotronu při teplotě 25/18 °C (den/noc) a 16 h fotoperiodě.

Tab. 4 Příprava Hoaglandova roztoku.

Složení	Molekulová	Koncentrace	objem[ml/l]	Výsledná
---------	------------	-------------	-------------	----------

	hmotnost	zásobných roztoků [mM]		koncentrace [μM]	
KNO ₃	101,1	1000	1,5	1500	
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	236,16	1000	1	1000	
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000	0,5	500	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246,49	1000	0,25	250	
KCl	74,55	50	}	50	
MnSO ₄ · H ₂ O	169,01	2		2	
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	287,55	2		1	2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249,75	0,5		0,5	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	161,97	0,5		0,5	
H ₃ BO ₃	61,84	25	0,5	12,5	
FeEDTA	381,08	20	1	20	





Obr. 5 Bobtnání (A), rolování (B), klíčení (C-F) a pěstování (G-I) semen hrachu setého.

1.B PŮSOBENÍ STRESOVÝCH FAKTORŮ

1.1. Teoretický úvod

Rostliny jsou během svého života vystaveny měnícím se podmínkám vnějšího prostředí. Tyto změny mohou zpomalovat životní funkce rostlin a při překročení určité hranice (tzv. hranice tolerance) dochází k poškození jednotlivých orgánů nebo dokonce k uhynutí (Procházka et al., 1998). Trvalé působení nevhodných podmínek vnějšího prostředí na rostliny vede ke stresu (Bohnert & Sheveleva, 1998). Jako stres je obvykle označován stav, kdy se rostlina nachází pod vlivem stresorů (stresových faktorů), které mohou být povahy abiotické nebo biotické.

V rostlinách je biotický stres způsoben biotickými faktory (herbivorní živočichové, patogenní mikroorganismy, vzájemné ovlivňování). Mezi vzájemné ovlivňování patří parazitismus a alelopatie. Při alelopatii rostlinné sekundární metabolity (terpeny, fenolické látky,...) působí inhibičně až toxicky na jiné rostliny vyskytující se v těsné blízkosti. Mezi živočichy, které poškozují rostlinné orgány, patří hmyz a býložravci. Pro omezení herbivorie u rostlin dochází k morfologickým, morfogenetickým (ostré trny, trichomy, vysoký obsah tuhých sklerenchymatických pletiv, schopnost rychlé regenerace poškozených orgánů,...) a biochemickým adaptacím. Mezi širokou škálu potenciálních patogenů patří viry, bakterie, houby, oomyceta a nematoda.

Abiotický stres je způsoben převážně extrémními klimatickými podmínkami (chlad, horko, sucho) a nevhodným složením půdy (polutanty, zasolení, nedostatek živin) (Mittler, 2006). Životní prostředí dnes obsahuje velké množství toxických látek. Kadmium, rtuť a jiné kovy, unikající z průmyslových provozů, znečišťují vodu, půdu i vzduch. Rostliny jsou tak vystaveny vyšším koncentracím kovů, což ovlivňuje jejich růst a produktivitu.

Rostliny mají vyvinuté významné strategie přizpůsobení se vnějším změnám za použití řady stálých nebo indukovaných biochemických a molekulárních mechanismů. Příslušná odpověď rostliny nastává po rozpoznání extracelulárního signálu a jeho přenosem do buněk (Procházka et al., 1998). Aby bylo možno zabránit těmto negativním vlivům působení stresu, je třeba důkladně zkoumat mechanismy, kterými jednotlivé stresové faktory na rostliny působí.

1.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

AlCl_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, FeEDTA , H_3BO_3 , KCl , KNO_3 , NaCl , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, manitol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, tekutý dusík.

Materiál:

Alobal, buničina, ependorfky, filtrační papír, igelitové kryty, igelitové sáčky, kádinky, korkovrt o průměru 12 mm, nádoby pro pěstování rostlin, ostříč, Petriho misky, pinzeta, pipety, pěstební boxy, prkénko.

Rostlinný materiál:

Rostliny *L. esculentum* cv. Amateur, *L. esculentum* cv. Lucy, *C. sativus*, *C. melo*, semena *P. sativum* cv. Lantra a cv. Lincoln, *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii* (LA 2663).

Patogen:

O. neolycopersici, *G. cichoracearum* (Gc 51/01).

Přístroje:

Fytotron, hlubokomrazicí box, chladicí box, pH metr, termostat, akvarijní motorek.

1.3. Pracovní postup

1.3.1. Inokulace patogenem *O. neolycopersici*

1.3.1.1. Příprava inokula

Pro experimenty použijeme izolát padlí rajčatového *O. neolycopersici* (C-2), získaný z rajčete (cv. Lucy), pěstovaného ve skleníku Státní rostlinolékařské správy, Olomouc.

1. Izolát udržujeme na 2-3 měsíce starých rostlinách vysoce náchylného genotypu rajčete *L. esculentum* cv. Amateur. Kvůli zabránění volnému šíření konidií přikryjeme rostliny igelitovými kryty.
2. Tyto rostliny poté umístíme do fytotronu při teplotě 20 °C a fotoperiodě 12/12 h (den/noc).
3. V dvoutýdenních intervalech preinokulováváme padlí rajčatové na nové zdravé rostliny.

1.3.1.2. Vlastní inokulace testované rostliny

1. Čtvrtý pravý list rostlin *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii* inokulujeme na svrchní straně konidiemi *O. neolycopersici* metodou otisku napadenými listy rajčat, které byly z 80-100 % pokryty čerstvým sporulujícím myceliem. Inokulaci provedeme na začátku světelné fáze.
2. Po inokulaci umístíme rostliny zpět do fytotronu, kde je dále pěstujeme za stejných podmínek.
3. Kontrolní (neinokulované) rostliny kultivujeme odděleně za stejných podmínek.
4. Ve vhodných časových intervalech realizujeme odběry vzorků (např. 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 a 216 h po inokulaci (hpi)). V každém odběru odebíráme listy ze tří rostlin.
5. Vzorky buď okamžitě zpracujeme nebo rychle zamrazíme pomocí tekutého dusíku a skladujeme v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

1.3.2. Inokulace patogenem *G. cichoracearum*

1.3.2.1. Příprava inokula

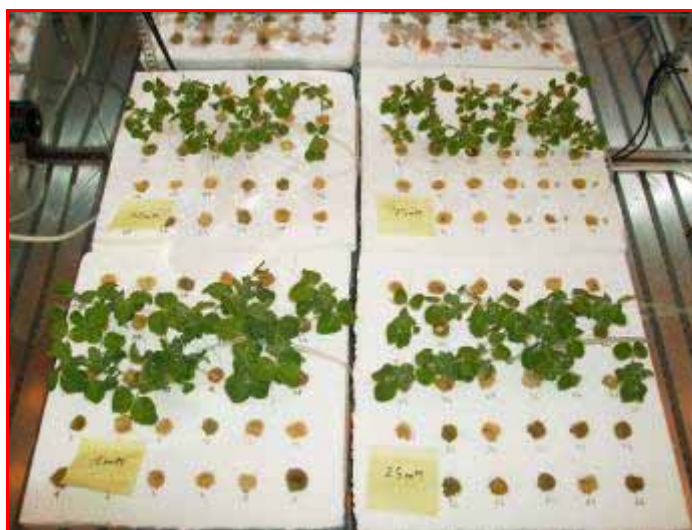
1. Izolát patogenu *G. cichoracearum* (Gc 51/01), poskytnutý katedrou Botaniky Palackého Univerzity v Olomouci, namnožíme na semenáčcích náchylného genotypu *C. sativus*.
2. Semenáčky dále pěstujeme ve fytotronu při 12 h světelném režimu a při teplotách 18/15 °C (den/noc).
3. Dva týdny po inokulaci semenáčků použijeme konidie padlí k inokulaci pokusných rostlin nebo listových disků.

1.3.2.2. Vlastní inokulace testované rostliny

1. Sporulující mycelium *G. cichoracearum* Gc 51/01 přeneseme z listů semenáčku *C. sativus* kontaktem listu se 4.-5. nejmladším listem pokusné rostliny *C. sativus* a *C. melo*.
2. K zamezení šíření patogenu na přilehlé listy zabalíme inokulovaný list do igelitového sáčku s odstříženým otvorem (pro respiraci listu).
3. Kontrolní neinokulované rostliny pěstujeme za stejných podmínek jako inokulované rostliny, ale prostorově odděleny.

1.3.3. Salinitní a osmotický stres

1. Šestidenní semenáčky hrachu setého po naklíčení transplantujeme do nádob obsahujících modifikovaný Hoaglandův roztok (tab. 4) s 1 mM NaCl nebo manitolem, pH 6.
2. Po třídní adaptaci vystavíme rostliny postupnému zasolování.
3. 9., 11. a 13. den po vysetí přidáváme 25 mM NaCl nebo manitol pro vytvoření 4 salinitních/osmotických prostředí, 1 kontrolní (1 mM NaCl/manitol) a 3 salinitní/osmotické s koncovou koncentrací 15. den po vysetí 25, 50 a 75 mM NaCl nebo manitol.
4. Rostliny tak pěstujeme 9 dnů ve fytotronu při teplotě 25/18 °C (den/noc) a 16 h fotoperiodě (obr. 11).



Obr. 11 Hrách setý pěstovaný 9 dnů v různé koncentraci NaCl: 1 mM (vlevo dole), 25 mM (vpravo dole), 50 mM (vlevo nahoře) a 75 mM (vpravo nahoře).

1.3.4. Teplotní a chladový stres

Pro experiment použijeme dva genotypy *Lycopersicon* spp.: *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii* (LA 2663) ve stáří cca 10 týdnů pěstované ve skleníku při 20 °C a 12 h fotoperiodě. Experiment provedeme dvojím způsobem (obr. 12, tab. 6).

1.3.4.1. Diskové uspořádání experimentu

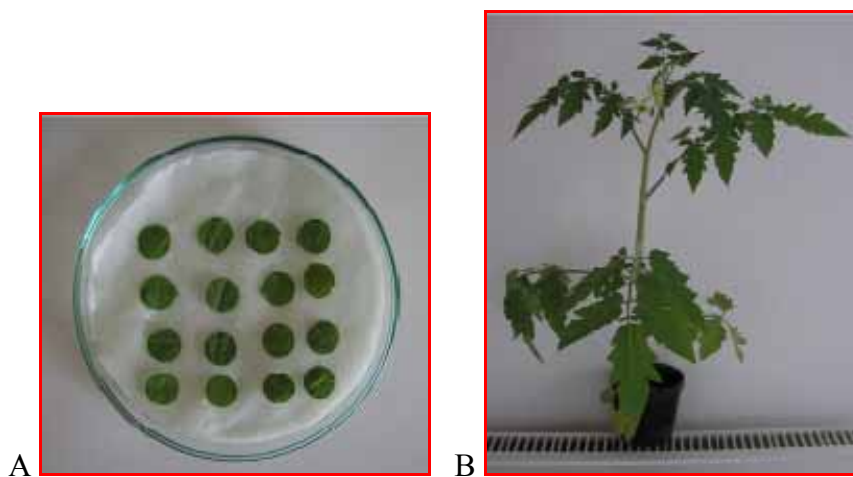
1. Připravíme si Petriho misky na jejichž dno dáme 3 vrstvy buničiny a jedno kolečko filtračního papíru.
2. Na každou misku napipetujeme 10 ml destilované vody.
3. Ze 4. pravých listů rostlin vykrojíme pomocí korkovrtu o průměru 12 mm listové disky.
4. Na vlhký filtrační papír umístíme vždy 16 listových disků.
5. Petriho misky s disky umístíme na 2 h do 3 teplotních prostředí: 26 °C (kontrola) – fytotron, 5 °C (chladový stres) – chladicí box a 40 °C (teplotní stres) – termostat.
6. Odebíráme vždy 4 disky z každé misky v časových intervalech 8, 24, 48 a 72 h po vystavení stresu (hps).
7. Odebrané vzorky v ependorfkách zamrazíme.

1.3.4.2. Experiment realizovaný na celých rostlinách

1. Rostliny umístíme na 2 h do 3 teplotních prostředí: 26 °C (kontrola) – fytotron, 5 °C (chladový stres) – chladicí box a 40 °C (teplotní stres) – termostat.
2. Po 2 h vystavení rostlin teplotnímu stresu přeneseme všechny rostliny do fytotronu s teplotou 26 °C.
3. V časových intervalech 8, 24, 48 a 72 h po vystavení stresu vykrojíme ze 4. pravých listů rostlin pomocí korkovrtu o průměru 12 mm 4 listové disky.
4. Odebrané vzorky v endorfkách zamrazíme.

Tab. 6 Porovnání testovací metody v diskovém uspořádání a při realizaci na celých rostlinách.

Experim. krok	Diskové uspořádání experimentu	Experiment realizovaný na celých rostlinách
1.	Příprava disků z listů rostlin, a jejich umístění do Petriho misek.	-
2.	Vystavení disků teplotnímu nebo chladovému stresu po dobu 2 h.	Vystavení celých rostlin teplotnímu nebo chladovému stresu po dobu 2 h.
3.	Odběr disků ve zvolených časových intervalech.	Ve zvolených časových intervalech příprava disků z listů rostlin.
4.	Zmrazení odebraných vzorků.	



Obr. 12 Testovací metoda v diskovém uspořádání (A) nebo při realizaci na celých rostlinách (B).

1.3.5. Vliv těžkých kovů

1. Šestidenní semenáčky hrachu setého po naklíčení transplantujeme do nádob obsahujících modifikovaný Hoaglandův roztok, pH 6 (tab. 4) obsahující 0- 0,1-10 mM CdCl_2 nebo AlCl_3 .
2. Rostliny pěstujeme 9 dnů ve fytotronu při teplotě 25/18 °C (den/noc) a 16 h foteriodě.

2. PŘÍPRAVA PROTOPLASTŮ

2.1. Teoretický úvod

Protoplast je část buňky, kterou obaluje cytoplazmatická membrána. Z tohoto důvodu se pojem protoplast užívá u buněk rostlinných, bakteriálních a buněk hub, které byly zbaveny své buněčné stěny, a to buď mechanickým nebo enzymovým procesem. Cytoplazmatická membrána protoplastů tvoří jedinou bariéru mezi vnějším okolím a vnitřní cytoplazmou buňky (Fowke & Constabel, 1985). Protoplasty lze izolovat z různých rostlinných pletiv a orgánů. Jedná se o totipotentní buňky, které jsou schopny při správných chemických a fyzikálních podnětech regenerovat novou buněčnou stěnu a mitoticky se dělit. Z nové dceřiné buňky se může za vhodných podmínek regenerovat nová rostlina (Davey et al., 2005).

Protoplasty mohou být izolovány mechanicky nebo enzymaticky (Davey et al., 2005; Navrátilová, 2004). Poprvé provedl izolaci protoplastů Klerceker roku 1892, a to mechanickým způsobem (mikrochirurgicky) z pletiva rostliny *Stratiotes aloides*. Tato historicky významná metoda se však již nepoužívá pro malou výtěžnost izolovaných protoplastů (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004).

Pokud je třeba získat větší množství protoplastů, je nutno provést enzymatickou izolaci. Ta byla poprvé realizována roku 1960 Cockingem (Fowke & Constabel, 1986). K enzymatické degradaci buněčné stěny slouží zejména celulasy (EC 3.2.1.4, 1,4-(1,3;1,4)- β -D-glukan-4-glukanohydrolasa) a hemicelulasy (EC 3.1.1.73, 4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl-sacharidhydrolasa), které rozruší vlastní buněčnou stěnu, a pektinasy (EC 3.2.1.15, poly(1,4- α -D-galakturonid)glykanohydrolasa) zajišťující rozpuštění střední lamely, a tím rozpad pletiva na jednotlivé buňky (Davey et al., 2005; Navrátilová, 2004). K izolaci protoplastů lze použít také macerozým R-10 (směs pektinasy, celulasy a hemicelulasy) (Navrátilová, 2004) a driselasu (EC 3.2.1.23, β -D-galaktosidgalaktolyasa) (Gajdová et al., 2007).

Protoplastové kultury již byly připraveny z řady druhů jednoděložných i dvouděložných rostlin (Davey et al., 2005). Protoplasty je možno izolovat z různých rostlinných pletiv a orgánů, neboť všechny buňky v rostlinném organismu jsou totipotentní. Nejvhodnějším zdrojem buněk pro protoplastové kultury jsou však málo diferenciované buňky, např. embryonální nebo meristematické (Petřek et al., 2006; Davey et al., 2005).

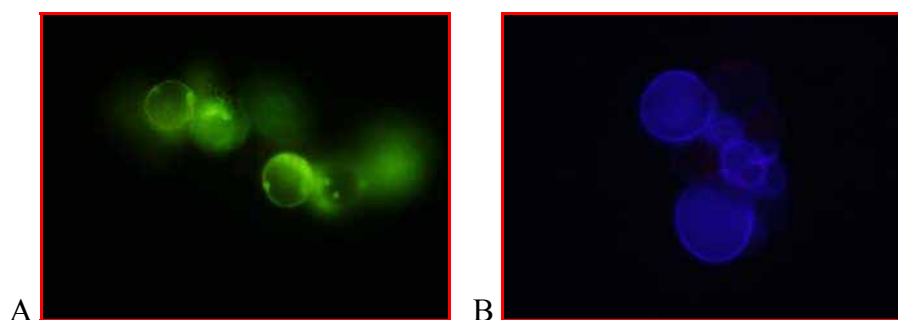
Úspěšnost izolace protoplastů je ovlivněna řadou faktorů. Patří mezi ně např. rostlinný materiál (druh, kultivar) a jeho fyziologický stav, teplota, složení enzymatických směsí, doba působení enzymů, pH a osmotické podmínky během izolace (Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005).

Po enzymatické izolaci je třeba oddělit protoplasty od nenatrávených buněk a komponentů, vzniklých rozrušením střední lamely buněk během inkubace s enzymy. Nejprve je suspenze filtrována přes ocelové sítko nebo nylonovou membránu o velikosti pórů 50-100 μ m (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004). Poté je provedena centrifugace (75-100 g, 3-10 min, 3-4x), aby došlo k odstranění poškozených buněk a enzymů (Navrátilová, 2004).

Supernatant je odstraněn a sediment obsahující protoplasty je rozsuspendován v roztoku sacharosy (20%). Tato suspenze je poté převrstvena promývacím roztokem nebo roztokem osmotika a opět následuje centrifugace. Během ní protoplasty vyplouvají na povrch roztoku sacharosy a oddělí se od nečistot. Po centrifugaci jsou protoplasty odebrány z vrstvy na rozhraní roztoku sacharosy a promývacího roztoku, tzv. flotujícího kroužku protoplastů. Poté jsou protoplasty 2-3x promyty promývacím roztokem (Navrátilová, 2004). Je možno použít také jiné gradienty využívající např. fikol (Gupta & Durzan, 1986), manitol (Kovalenko et al., 2004), sorbitol (Lindberg et al., 2007) nebo Percoll (Bennett et al., 2001).

Úspěšnost izolace protoplastů lze zhodnotit stanovením výtěžnosti izolace a životnosti připravených buněk. Výtěžnost je stanovována pomocí hemocytometru (Bürkerova komůrka), poté je buněčná suspenze naředěna kultivačním médiem na požadovanou hustotu. Je důležité zvolit vhodnou výslednou hustotu protoplastů, protože ta ovlivňuje např. buněčné dělení a vznik mikrokalusu (Fowke & Constabel, 1986; Kováč, 1995). Za optimální je obvykle považována hustota 5×10^4 - 10^6 na 1 ml média (Davey et al., 2005).

Testování životnosti je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Jako sondy pro stanovení životnosti buněk slouží fluorogenní substráty esteras, které mohou pasivně pronikat do buněk. Měří se zachování enzymové aktivity buněčných esteras. Životnost protoplastů lze stanovit několika metodami. Nejčastěji se provádí vitální barvení fluorescein diacetátem (FDA) (obr. 6). Ten prochází přes plazmatickou membránu a v živých protoplastech je metabolizován na fluorescein, který lze detekovat UV zářením a pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu. Dalšími používanými barvivy jsou neutrální červeň (hromadí se v metabolicky aktivních buňkách), Evansova modř (živé buňky ji nepropustí přes plazmatickou membránu), Calcofluor MR2 nebo Calcofluor white (obr. 6) (vážou se na nově vznikající buněčnou stěnu živých buněk; fluorescenční sondy) (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004), fenolsafranin (živé buňky jej nepropustí přes plazmatickou membránu), methylenová modř (v živých buňkách je redukována na žluté barvivo) (Fowke & Constabel, 1986) a MTT (živými buňkami metabolizován na formazanové barvivo) (Plumb, 2004).



Obr. 6 Stanovení životnosti protoplastů *C. sativus* (zvětšeno 200x). Metoda FDA – živé protoplasty metabolizující FDA na zeleně fluoreskující fluorescein (A). Metoda Calcofluor white – živé buňky produkující celulosu modře fluoreskují (B).

Rozhodujícími faktory při kultivaci protoplastů jsou teplota (22-30 °C), intenzita světla (2000-5000 lux) (Barsby et al., 1986) a složení kultivačního média, zvláště pak obsah cukrů (Navrátilová, 2004). Pro kultivaci protoplastů se používají tekutá, polotuhá a tuhá média (Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005).

Tekuté kultury v Petriho miskách patří mezi nejběžnější metody kultivace protoplastů. Jejich výhodou je snadná kontrola a změna hustoty protoplastů a osmotických podmínek během kultivace (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004). Nejjednodušším použitím tekutých kultur je umístění suspenze protoplastů v tekutém kultivačním médiu na dno Petriho misky (Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005). Vrstva média s protoplasty musí být tenká (asi 1mm), aby byl zaručen dobrý přístup kyslíku ke všem buňkám (Fowke a Constabel, 1986). Pokud máme k dispozici pouze malé množství suspenze protoplastů lze použít také kapkovou (kapky po 40-100 μ l na dně nebo víčku Petriho misky), microchamber (kapky po 30 μ l obsahující 1 nebo několik protoplastů) nebo microdroplet kulturu (malé kapičky po 0,25-0,5 μ l obsahující vždy pouze 1 protoplast) (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005)

K přípravě tuhých médií se nejčastěji používají agar a agarosa, neboť nereagují s ostatními složkami médií a tuhnou za nízkých teplot (Navrátilová, 2004). Jako gelující

složka média může být použit také alginát, jehož ztuhnutí je způsobeno přidáním Ca^{2+} iontů. Protoplasty lze pak z alginátu uvolnit pomocí citronanu sodného, který odstraní ionty vápníku (Davey et al., 2005). Tuhé médium slouží jako podklad pro tekuté médium s protoplasty nebo jsou v něm přímo protoplasty zalaty. V druhém případě je gel s protoplasty po ztuhnutí nařezán na kostičky a přenesen do tekutého média (Fowke & Constabel, 1986; Navrátilová, 2004). Další možností je tuhé médium s protoplasty nakapat přímo na dno Petriho misky a po ztuhnutí jej převrstvit tekutým kultivačním médiem (Davey et al., 2005). Pokud tuhé médium slouží pouze jako podklad pro tekuté médium s protoplasty je vhodné obě vrstvy oddělit filtračním papírem. Ten později usnadní přenos buněk do nového kultivačního média. Pro oddělení vrstev je možno použít také membránový filtr, celulóзовou membránu nebo nylonovou síťku (Davey et al., 2005).

Protoplasty izolované z různých druhů rostlin a dokonce z různých zdrojů (list, kalus) u stejného druhu mají odlišné nároky na výživu. Optimální médium pro dlouhodobou kultivaci je vždy nutno stanovit empiricky (Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005). Kultivační média pro protoplasty jsou většinou modifikovaná média používaná pro kultivaci rostlin *in vitro*. Obsah anorganických solí je stejný jako v médiích pro rostliny, v případě makroprvků se snižuje na polovinu. Médium dále obsahuje vitamíny a růstové hormony (kombinace cytokininů a auxinů) a osmotikum. Zdrojem energie a uhlíku bývá glukosa nebo sacharosa (Davey et al., 2005). Většina médií je odvozena od MS (Murashige & Skoog, 1962) a B5 médií (Gamborg et al., 1968), ke kterým je přidáno osmotikum, obvykle nemetabolizovatelný cukerný alkohol jako je manitol nebo sorbitol (Davey et al., 2005).

Proces regenerace rostlin z izolovaných protoplastů zahrnuje tři na sebe navazující fáze. Tyto fáze jsou definované složením kultivačních médií s rozdílným obsahem auxinů, cytokininů a osmotik (Nagata & Takebe, 1971). Protoplasty buněk jsou ve fázi G0. K jejich navrácení do buněčného cyklu je třeba specifických podnětů fyzikálního nebo chemického charakteru (např. složení média – vhodná koncentrace růstových látek). Tyto podněty mohou být příčinou, proč se nedaří vždy indukovat dělení buněk (Navrátilová, 2003).

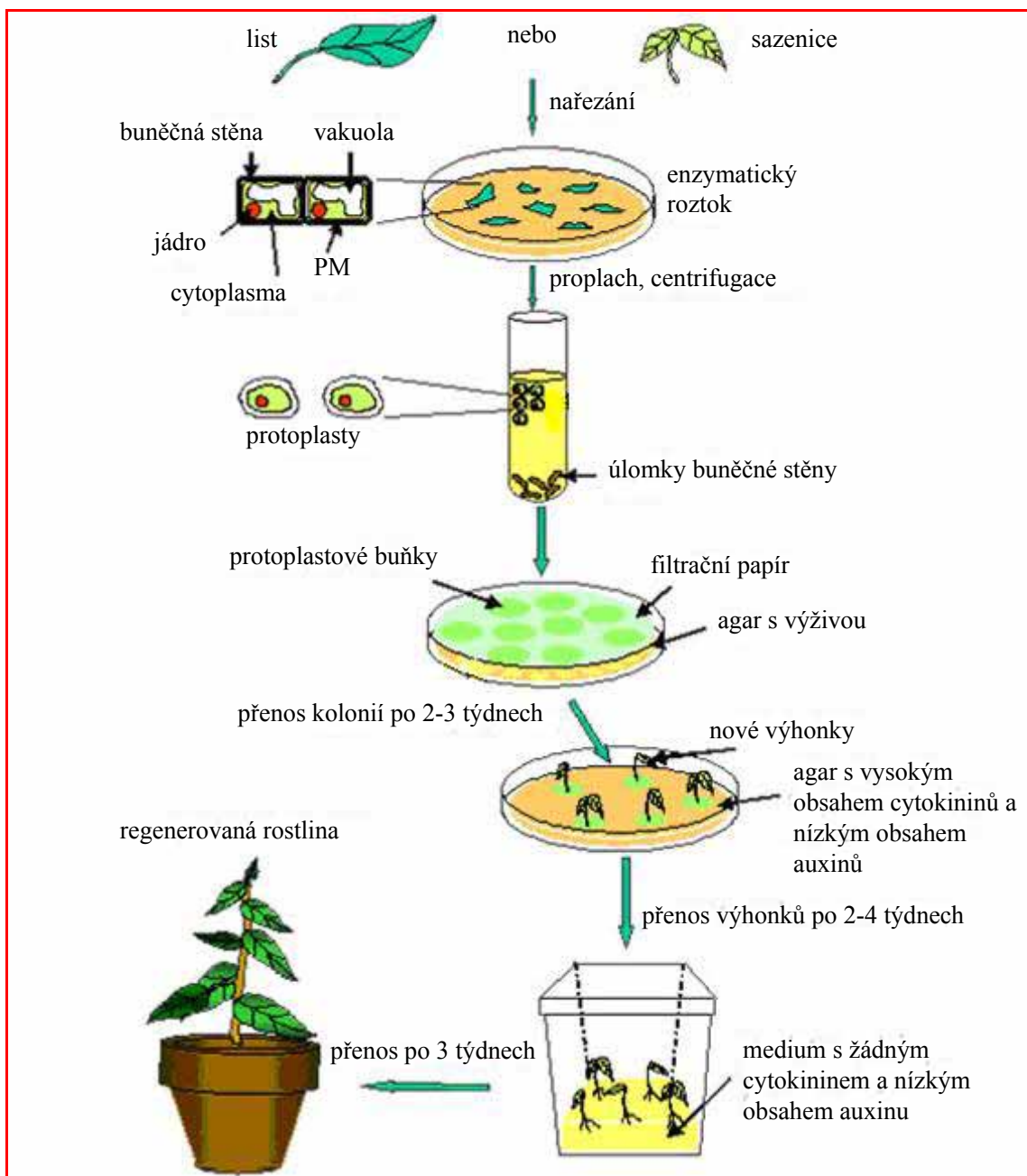
První fáze - iniciační. Kultivační médium obsahuje látky vhodné pro tvorbu nové buněčné stěny a iniciaci prvního dělení buněk až po tvorbu volně viditelných kolonií a mikrokalusů. Médium obsahuje osmotika, vitamíny, růstové látky, cukry a soli. První viditelný signál růstu protoplastů zahrnuje uspořádání většiny organel kolem jádra a tvorbu nové buněčné stěny (Willison & Cocking, 1975). Během 1-2 dnů kultivace ztrácí protoplasty svůj sférický tvar, to nasvědčuje tomu, že došlo k obnově buněčné stěny.

Druhá fáze - diferenciační. Médium indukující tvorbu výhonků na kalusu je charakteristické svým nižším obsahem auxinů a vyšším obsahem cytokininů. V tomto stádiu lze přejít z tekutých a polotekutých forem médií na pevná agarová média.

Třetí fáze - koření. Médium je zpravidla bez růstových látek. Podporuje tvorbu kořenů na výhoncích, které byli oddělené od kalusů (Dedičová, 1995).

Úspěšná regenerace rostlin (obr. 7) se zdá být geneticky podmíněná (Roest & Gilissen, 1989). Jsou rostlinné druhy a typy pletiv, u kterých se regenerace rostlin z protoplastů podařila, naopak u řady dalších rostlinných druhů bylo dosaženo jen několika dělení po regeneraci buněčné stěny.

Rostlinné protoplasty představují unikátní a jednoduchý buněčný systém, který je vhodný pro výzkum v mnoha oblastech moderní biotechnologie. Nejčastěji jsou protoplastové kultury využívány např. při studiu syntézy buněčné stěny a transportu přes buněčnou stěnu. Používají se také při somatické hybridizaci (fúze protoplastů), inkorporaci exogenního genetického materiálu (cybridizace) nebo genové transformaci rostlin (Navrátilová, 2004; Davey et al., 2005). Rostlinné protoplasty jsou také používány při studiu abiotického stresu, např. stresu těžkými kovy (Parys et al., 1998), teplotního (Dong et al., 2007) a salinitního stresu (Lynch et al., 1989).



Obr. 7 Regenerace rostlin z protoplastů. PM, plazmatická membrána.

2.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

2,4-D, alanin, askorbová kyselina, B5 médium + vitamín, BAP, celulosa Onozuka R-10, CaCl_2 (bezvodý), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ethanol, FDA, glukosa, glutamin, glycin, chloramin B, IBA, kasein hydrolyzáta, KH_2PO_4 , KI, KNO_3 , LCM1, macerozym R-10, manitol, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MES, MTT, myo-inositol, NAA, prolin, sacharosa.

Materiál:

Automatické pipety, Bürkerova komůrka, centrifugační zkumavky, krycí sklíčka, nylonová síťka, Pasteurova pipeta, Petriho misky, podložní sklíčka, skalpel, skleněné zkumavky.

Rostlinný materiál:

Rostliny *C. sativus* cv. Marketer, *L. esculentum* cv. Amateur a *L. chmielewskii*.

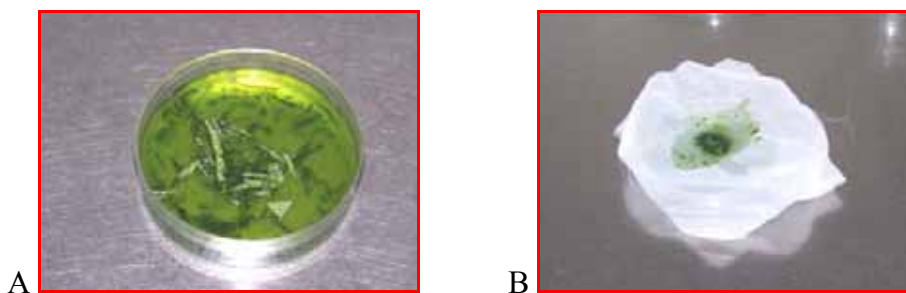
Přístroje:

Analytické váhy, digitální pH metr, digitální předvážky, elektromagnetická míchačka, flow-box, chlazená centrifuga, světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 s digitální chlazenou kamerou, termostat, termostatická skříň, třepačka.

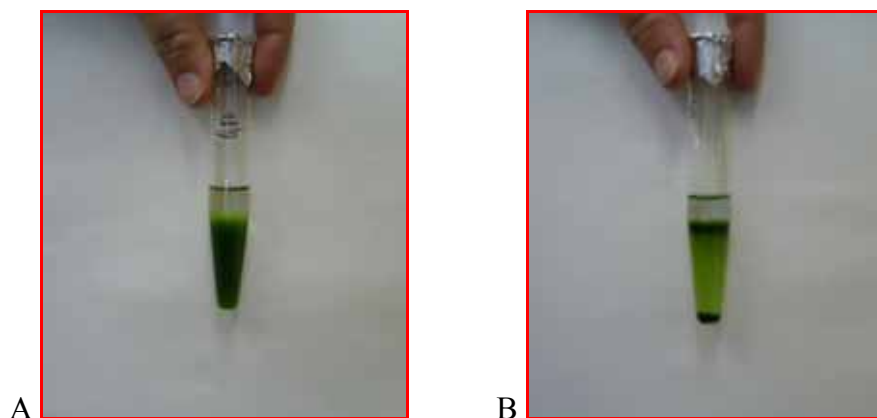
2.3. Pracovní postup

2.3.1. Izolace protoplastů

1. Z dobře *in vitro* rostoucí a kořenící rostliny 4 týdny po naklíčení rostlin odebereme 2 až 3 plně vyvinuté mladé listy.
2. 0,5 g listů sterilně (ve flow-boxu) nařezeme na 1 mm proužky a vložíme do enzymového roztoku (6 ml) v Petriho misce (průměr 6 cm).
3. Segmenty listů v enzymové směsi inkubujeme ve tmě, v termostatu při teplotě 25 °C po dobu 18 h (tab. 2, obr. 8). Pokud je pletivo nedostatečně macerované, umístíme Petriho misky se vzorky v závěru inkubace na 10-20 min na třepačku.
4. Po inkubaci suspenzi protoplastů a nerozložených částí listů sterilně přefiltrujeme přes speciální technickou síťovinu uhelon o velikosti pórů 72 μm (obr. 8) a doplníme promývacím roztokem PGly (Debeaujon & Branchard, 1992) na objem 6 ml.
5. Pasteurovou pipetou přeneseme směs do sterilní centrifugační zkumavky a centrifugujeme při 800 g po dobu 5 min.
6. Po odstranění supernatantu sediment resuspendujeme ve 4 ml 20% roztoku sacharosy a opatrně převrstvíme 2 ml promývacího roztoku PGly tak, aby nedošlo k promíchání.
7. Opět provedeme centrifugaci po dobu 10 min při 800 g. Při centrifugaci vzniká na rozhraní roztoku sacharosy a PGly vrstva flotujících protoplastů (obr. 9), kterou odebereme Pasteurovou pipetou a přemístíme do čisté sterilní centrifugační zkumavky.
8. Odebrané protoplasty resuspendujeme ve 4 ml promývacího roztoku a opět centrifugujeme 5 min při 800 g.
9. Po odstranění supernatantu protoplasty resuspendujeme v 1 ml kultivačního média LCM1 (tab. 5, Debeaujon & Branchard, 1992).



Obr. 8 Izolace protoplastů. Listy *C. sativus* nařezané na tenké proužky po 18 h inkubaci v enzymovém roztoku (A). Filtrace izolovaných protoplastů přes nylonovou síťku o velikosti pórů 72 μm (B).



Obr. 9 Izolace protoplastů hustotní gradientovou centrifugací. Suspenze protoplastů po filtraci a prvním centrifugačním kroku (A). Flotující proužek protoplastů po centrifugaci v hustotním gradientu (20% roztok sacharosy převrstvený PGly médiem) (B).

Tab. 5 Složení PGly média (Debeaujon & Branchard, 1992), sacharosového gradientu (Gajdová et al., 2007), LCM1 média (Debeaujon & Branchard, 1992) a enzymatického roztoku.

Roztok	Složení	Množství [g/l]
PGly	KH ₂ PO ₄	0,0272
	KNO ₃	0,101
	CaCl ₂ (bezvodý)	1,1176
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246
	KI	0,00016
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,000025
	glycin	11,15
	glukosa	18,016
	MES	0,5857
	manitol	65,58
	<i>pH 5,8</i>	
	<i>sterilizace filtrací</i>	
Gradient	sacharosa	200
	<i>pH 5,8</i>	
	autoklávováno	
LCM1 médium	B5 (Gamborg)	dle výrobce
	myo-inositol	0,9
	kyselina askorbová	0,002
	glycin	0,008
	glutamin	0,02
	kasein hydrolyzáát	0,1
	MES	0,586
	manitol	70
	sacharosa	10
	glukosa	5
	NAA	0,001
	2,4-D	0,0005
	BAP	0,00075
	alanin	0,004

	prolin <i>pH 5,7-5,8</i> <i>sterilizace filtrací</i>	0,02
Enzymatický roztok	celulasa Onozuka R-10 macerozym R-10 do promývacího roztoku PGly <i>pH 5,8</i> <i>sterilizace filtrací</i>	10 2,5

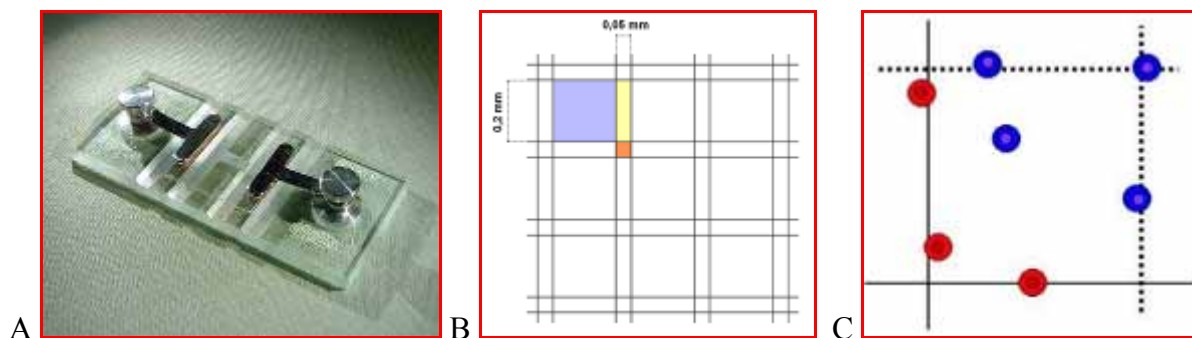
2.3.2. Stanovení hustoty protoplastů

Hustota suspenze vyizolovaných protoplastů v médiu byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky (obr. 10). Komůrka obsahuje dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na devět velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše $1/25 \text{ mm}^2$ a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou $1/400 \text{ mm}^2$. Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy $1/100 \text{ mm}^2$. Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání buněk vysoký 0,1 mm.

1. Před nanesením buněčné suspenze umístíme krycí sklíčko na počítací povrch Bürkerovy komůrky.
2. Pomocí Pasteurovy pipety nanese roztok do jedné z V-tvarovaných prohlubní. Oblast pod krycím sklíčkem je naplněna pomocí kapilární elevace. Nanese takové množství kapaliny, aby byl zrcadlový povrch zakryt a pod sklíčkem nebyly vzduchové bubliny.
3. Poté naplněnou počítací komůrku umístíme pod mikroskop.
4. Pro provedení měření určíme potřebné zvětšení pro rozpoznání zadaného typu buňky.
5. Nyní systematicky počítáme buňky ve vybraných čtvercích tak, aby celkový počet byl cca 100 buněk. V případě velkých buněk počítáme ve čtyřech velkých rohových čtvercích a jednom prostředním. Husté roztoky malých buněk vyhodnocujeme ve čtyřech rohových $1/25 \text{ mm}^2$ čtvercích plus prostředním čtvercem lokalizovaném v centrálním čtverci.
6. Abychom dostali finální počet buněk/ml, nejdříve vydělíme celkový počet číslem 0,1 mm (hloubka komůrky) a potom vydělíme výsledek celkovou plochou, na které jsme počítali. Například, jestliže jste spočítali 125 buněk na každém velkém rohovém čtverci plus ve středu, vydělíme číslo 125 číslem 0,1 a poté 5 (celková oblast počítání, každý velký čtverec má 1 mm^2 , celkem 5 čtverců).

$$125/0,1 = 1250. \quad 1250/5 = 250 \text{ buněk/mm}^3$$

Výsledná hustota je 250 000 buněk/ml ($1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$). Občas budeme potřebovat zředit buněčný roztok, abychom dostali hustotu buněk potřebnou pro počítání. V tomto případě budeme muset vynásobit náš výsledek rozředovacím faktorem.



Obr. 10 Bürkerova komůrka (A), schéma Bürkerovy komůrky (B), schéma počítání protoplastů v Bürkerově komůrce. Počítáme např. protoplasty dotýkající se levé a horní strany obvodu pole, protoplasty dotýkající se pravé a spodní strany nepočítáme (C).

2.3.3. Stanovení životnosti protoplastů

1. K 50 μ l buněčné suspenze na podložním sklíčku přidáme 5 μ l FDA o koncentraci 25 μ g/ml.
2. Po 5 min inkubaci vyhodnotíme 10 zorných polí. V každém poli nejprve spočítáme všechny buňky v procházejícím světle.
3. Živé buňky zeleně fluoreskující spočítáme s využitím hranolu U-MWB2 fluorescenčního mikroskopu Olympus BX50.
4. Životnost stanovíme jako procentuální podíl součtu živých buněk k celkovému počtu buněk v 10 zorných polích.

2.3.4. Kultivace protoplastů

1. Po stanovení hustoty protoplastů přidáme k buněčné suspenzi kultivační médium LCM1 tak, aby výsledná hustota byla 10^5 protoplastů na 1 ml média.
2. Protoplasty kultivujeme v Petriho miskách o průměru 3,5 nebo 6 cm ve tmě při teplotě 27 °C po dobu 1-14 dnů.
3. Protoplasty použijeme pro následující experimenty při studiu obranných mechanismů rostlin po ovlivnění vybranými stresovými faktory.

2.4. Vyhodnocení výsledků

Do tabulky přehledně uvedeme:

1. výchozí množství rostlinného materiálu
2. objem vyizolované protoplastové suspenze
3. hustotu
4. počet vyizolovaných protoplastů přepočítaný na g výchozího rostlinného materiálu
5. životnost vyizolovaných protoplastů.

2.5. Kontrolní otázky

1. Jaké enzymy se nejčastěji používají při izolaci protoplastů? Do které třídy jsou tyto enzymy řazeny?
2. Co je to protoplast?
3. Jaké dva druhy izolace protoplastů rozeznáváme?
4. Jaké znáte faktory ovlivňující úspěšnost izolace protoplastů?

3. Stanovení životnosti a buněčné smrti

Teoretický úvod

Buněčná smrt zajišťuje v organismu tkáňovou homeostázu mezi vznikem a zánikem buněk, která znamená udržení optimálního počtu správně fungujících buněk v jednotlivých orgánech. V živém organismu se setkáme s různými formami buněčné smrti (Obr. 2), které lze dělit např. následovně:

1. Programovaná buněčná smrt (Programmed cell death = PCD)
 - a) Apoptosa, typ PCD I
 - b) Autofagická nekrosa, typ PCD II
2. Onkotická nekrosa
3. Další neprozkoumané formy buněčné smrti
 - a) Aponekrosa
 - b) Paraptosa

Termín programovaná buněčná smrt (PCD) byl poprvé publikován v roce 1964. Představuje geneticky kódovanou buněčnou smrt, pro kterou je typický konzervovaný programový mechanismus a je charakteristická přesným načasováním i lokalizací v organismu. Jedná se o širší pojem než je apoptosa, nemusí mít vždy všechny její znaky (Lockhin & Williams, 1964; Willingham, 1999).

Apoptosa (z řečtiny *αποπτωδις*, *apo* = z a *ptosis* = padání) je jeden z hlavních a nejčastějších typů programované buněčné smrti buňky (Obr. 3). Je to proces úmyslné sebevraždy nechtěné buňky v mnohobuněčném organismu s geneticky řízeným, programovaným charakterem, regulovaným v mnoha stupních. Je aktivním procesem vyžadujícím energii. Apoptosa je spuštěna, jestliže buňka ztrácí kontakt s vnějším prostředím, pokud je buňka neopravitelně poškozena, dostává signály indukující apoptosu, neboli signály smrti. Pro stanovení a charakterizaci apoptosy se využívá studium kaspasové aktivity, exprese „apoptosis-related“ proteinů, změn cytoplasmatické membrány, kdy se sleduje translokace fosfatidylserinu z cytoplasmatické strany buněčné membrány na její extracelulární stranu (metoda vazby Annexinu V), fragmentace DNA (metody DNA Laddering, ISNT, TUNEL), studium mitochondrií – při apoptose dochází k vylití cytochromu c a AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Barrett et al., 2001; Rode et al., 1998).

Buněčná smrt indukovaná během hypersensitivní reakce u rostlin je programovanou buněčnou smrtí analogickou apoptose u živočichů (Lam et al., 2001). Hypersenzitivní reakce je charakterizována rychlou smrtí individuálních rostlinných buněk, infikovaných patogenem, případně buněk sousedních (Atkinson et al., 1985).

Vitalita

Termín vitalita je možno vyložit jako životaschopnost - schopnost buňky, organismu nebo populace žít, udržovat a obnovovat životní funkce ve stále se měnících podmínkách životního prostředí. Poukazuje na fyziologický stav buňky a na její metabolickou aktivitu. V optimálních podmínkách je vývoj organismu plnohodnotný. Za nepříznivých, stresových podmínek dochází k poruchám vývoje (Procházka, 1967). Ke studiu vitality se v laboratorních podmínkách nejčastěji používají metody založené na metabolické aktivitě buňky nebo na měření některých buněčných složek, jako jsou zásobní látky, např. glykogen nebo adenosintrifosfát - ATP či redukované formy nikotinamidadeninukleotidu - NADH. Řada metod využívá fluorogenních substrátů pro detekci reakcí probíhajících v živých buňkách, např. FDA, BCECF AM, Calcein AM ... (Dostálek, 2005).

Viabilita

Viabilita je definována jako schopnost buněk reprodukce. Určuje, zda jsou buňky živé a vykazují metabolickou aktivitu. Označuje počet buněk v populaci, které jsou schopné růstu a dalšího rozmnožování. V laboratoři se stanovuje několika metodami s odlišným principem. Nejpřesnější, ovšem také časově nejnáročnější jsou metody založené na buněčné replikaci. Nejčastěji používané jsou metody založené na barvení buněk a méně rozšířené jsou metody jejichž principem je měření obsahu některých buněčných složek, ATP nebo NADH (Dostálek, 2005).

Typy buněčné smrti u rostlin

Buněčná smrt u rostlin je běžnou součástí jejich vývojových procesů (Tab. 2., Obr. 10) (Vianello et al., 2007). Uplatňuje se např. při formování květů, kdy dochází k zakrnutí samčích a samičích pohlavních orgánů (tyčinek a vajíček), při degradaci podpůrné buňky, endospermu a aleuronové buňky, dochází k ní při formování trichomů, senescenci listů, odumírání buněk kořenové čepičky nebo formování vzdušného pletiva (aerenchymu) (Beers, 1997; Gray, 2004). PCD se také objevuje při hypersenzitivní reakci způsobené interakcí mezi rostlinou a patogenem (Hatsugai et al., 2004).

Buňky tvoří různé kombinace signálů smrti se signály pro přežití a jejich výsledkem je nakonec rozhodnutí, zda, popř. jak k buněčné smrti dojde či nikoli (Obr. 11). O tom, jakým způsobem buňka zemře rozhodují enzymy ve vakuolách (hydrolasy). Buněčná smrt je spuštěna vyplavením Ca^{2+} a poškozením struktury vakuoly. Hydrolasy rozhodují jaký bude mít PCD důsledek, např. při autolyzi buněčného obsahu vzniká cévní vodivé pletivo (Obr. 12), při hydrolýze buněčné stěny vzniká pletivo aerenchym (Jones, 2001).

Tabulka Rozdíly buněčné smrti u živočichů a rostlin (Collazo et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2000).

Živočišná buňka	Rostlinná buňka
<ul style="list-style-type: none"> • U živočichů lze rozdělit buňky podléhající BS do 8 kategorií (viz tabulka 2). • Vznikají fragmenty DNA o velikosti přibližně 180 bp. • Ca^{2+}-závislé endonukleasy se ukazují jako zodpovědné za DNA fragmentaci, nukleasy jsou produkovány právě umírající buňkou. • Expozice fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány, demonstrováno metodou navázání Annexinu V. • Vždy dochází ke kondenzaci, fragmentaci cytoplasmy. • Smrštění buňky. • Aktivace enzymů kaspáz. • Antiapoptotický protein Bcl-2 potlačuje PCD. • ROS jsou signálními molekulami potřebnými k aktivaci PCD. • Nárůst hladiny cytosolárního Ca^{2+} aktivuje PCD prostřednictvím aktivace endonukleas a kaspas. • Role mitochondrie v průběhu PCD je velmi dobře známa. • Fosforylace/defosforylace proteinů je běžná u všech typů buněk. • Vždy kondenzace chromatinu. • DNA fragmentace je objasněna u všech typů buněk pomocí elektroforetických metod. • Vznikají typické apoptotické tělíška. • Nejsou syntetizovány stresové proteiny během buněčné smrti. 	<ul style="list-style-type: none"> • U rostlin je prokázáno 6 kategorií. Kategorie VI: Buněčná smrt buněk produkovaných v nadbytku a kategorie VIII: Buňky svou vlastní smrtí dávají podnět ke vzniku nemoci, nebyly u rostlin prokázány. • Větší DNA fragmenty o 50 kb (50 000 bp). • Nukleasy jsou produkovány některými umírajícími nebo přilehlými buňkami, není zcela objasněn jejich význam v PCD. Rostlinné nukleasy jsou závislé na množství Ca^{2+} nebo Zn^{2+}. • Stejně rychlá expozice fosfatidylserinu jako u živočišné buňky byla prokázána jen u protoplastu tabáku vystavenému abiotickému stresu. • Dochází ke kondenzaci cytoplasmy, ale neobjevuje se fragmentace. • Smrštění u většiny buněk, ne u všech. • K expresi kaspáz nemusí vždy dojít. • Protein Bcl-2 nepůsobí antiapoptoticky při hypersenzitivní reakci. • Zvýšená hladina cytosolárního Ca^{2+} aktivuje PCD prostřednictvím aktivace endonukleas, ale není prokázán vliv Ca^{2+} na aktivitu kaspas. • Fosforylace/defosforylace proteinů se objevuje jen při hypersenzitivní reakci buněk a u aleuronových buněk. • Kondenzace chromatinu u některých druhů umírajících buněk, ne u všech. • Elektroforetické metody objasňují apoptosu jen z některých typů buněk. • Nejsou zaznamenány typická apoptotická tělíška. • Stresové proteiny bohaté na hydroxyprolin, glycin a threonin jsou často syntetizovány a stávají se součástí buněčné stěny některých buněk podlehajících buněčné smrti

1. Metody stanovení vitality

Testování životnosti je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Pro stanovení životnosti lze využít mikroskopickou detekci. Metody stanovující životnost populace buněk se v laboratoři často provádí v 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Tato miniaturizace umožňuje analýzu mnoha vzorků v krátkém čase, minimalizuje se spotřeba kultivačního media i buněk. Metody se vyhodnocují s využitím mikrodestičkového readeru (Rode et al., 1998). Postupů pro stanovení buněčné vitality je velké množství, můžeme je rozdělit do tří základních skupin: 1. Metody založené na stanovení metabolické aktivity; 2. Metody založené na stanovení propustnosti buněčné membrány; 3. Metody detekující syntézu DNA jako indikátor růstu.

1.1. Metody založené na stanovení metabolické aktivity

Stanovení metabolické aktivity buněk je jedním z měřitelných parametrů

používaných ke studiu vitality buněk. Nejčastěji se používají metody založené na detekci enzymů s dehydrogenasovou a esterasovou aktivitou. Jako další parametr životnosti může být analyzovaná např. hladina ATP v buňce (Rode et al., 1998; Sieuwerts et. al, 1995).

1.1.1. Kolorimetrické metody využívající tetrazoliové soli MTT, XTT a WST-1

Soli tetrazolia jsou živými, metabolicky aktivními buňkami přeměněny na formazanové barviva analyzované spektrofotometricky s využitím mikrodestičkového readeru (Tab. 4, Obr. 15-18). Tetrazoliové soli jsou převedeny na formazan enzymem sukcinátdehydrogenasou (EC 1.3.99.1), který je součástí dýchacího řetězce mitochondrií. Tento enzym je aktivní pouze v živých buňkách. MTT v živé buňce tvoří nerozpustné barvivo, zatímco produkt reakce s XTT a WST-1 je rozpustný, v důsledku toho jsou metody s XTT a WST-1 experimentálně a časově méně náročné (Obr. 15) (Rode et al., 1998). Metoda s WST-1 je v porovnání s MTT a XTT 5x citlivější. V případě MTT je vzniklý produkt, tj. fialový ve vodě nerozpustný formazan rozpuštěn alkalickým roztokem DMSO.

Systematický název	
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
WST-1	4-[3-(4-Iodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát

Tabulka 4b Přehled tetrazoliových solí používaných při stanovení životnosti buněk (Rode et al., 1998; www.sigma-aldrich.com, 15.5. 2007).

	MTT test	XTT test	WST-1 test
Sumární vzorec	$C_{18}H_{16}BrN_5S$	$C_{22}H_{16}N_7NaO_{13}S_2$	$C_{19}H_{11}IN_5NaO_8S_2$
Mr	414,32	673,52	651,34
Stanovení	Vitality, proliferace, cytotoxicity	Vitality, proliferace, cytotoxicity	Vitality, proliferace, cytotoxicity
Vzorky	Populace, individuální buňky	Populace, individuální buňky	Populace, individuální buňky
Dekekcce	Živých buněk	Živých buněk	Živých buněk
Metoda	Inkubace buněk s MTT, rozpuštění produktu, spektrofotometrické vyhodnocení	Inkubace buněk s XTT, spektrofotometrické vyhodnocení	Inkubace buněk s WST-1, spektrofotometrické vyhodnocení
Vlnová délka	550-600 nm	450-500 nm	420-480 nm
Časová náročnost	4 hodiny	2-4 hodiny	0,5-2 hodiny

1.1.2. Fluorescenční metody využívající FDA, Calcein AM a BCECF AM

V praxi se velmi často využívají fluorescenční testy, které jsou mnohem citlivější než testy kolorimetrické, bezpečnější a levnější než testy využívající radionuklidy. Hlavní výhodou metod využívajících fluorescenční barvení je rychlost (výsledky získáme řádově

v minutách) a jednoduchost (Fišar, 2003; Rode et al., 1998). Testování životnosti a cytotoxicity je založeno na měření podílu živých a mrtvých buněk v populaci. Jako sondy pro stanovení životnosti buněk slouží fluorogenní substráty esteras, které mohou pasivně pronikat do buněk. Měří se zachování enzymatické aktivity buněčných esteras a současně membránová integrita, která zajišťuje nitrobuněčnou retenci vznikajících fluoreskujících produktů. Esterasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících alkoholy s krátkým uhlíkatým řetězcem. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterasy jako marker životaschopnosti buněk. Některé práce ukázaly, že aktivita intracelulárních esteras buněčné suspenze je přímo úměrná počtu živých buněk. Acetátový nebo acetoxymethylový ester vhodného fluoroforu se rozpustí v DMSO (dimetylsulfoxid) v koncentraci 1-10 mM a přidá k buňkám v konečné koncentraci 1-25 μ M. Jako jeden z prvních a dosud často používaný je fluorescein diacetát (FDA) (Tab 5, Obr. 19). Mezi nejlepší indikátory životnosti buněk patří Calcein AM (díky vysokému zachytu v živých buňkách a silné fluorescenci) (Obr. 20). Dalšími vhodnými indikátory životnosti jsou např. BCECF AM (Obr. 21), karboxyeosin diacetát, karboxyfluorescein diacetát.

1.1.3. Test s neutrální červení

Velmi často se pro stanovení životnosti buněk používá vitální barvivo neutrální červeň (NČ) (Tab. 5), které pasivně vstupuje do buněk (Obr. 22). V tomto případě je princip metody založen na příjmu vitálního barviva NČ životaschopnou buňkou, která ho ukládá do lysozomů (Maines, 1998; Rode et al., 1998).

Při hodnotě pH ve fyziologické oblasti je molekula NČ neutrální a prostupuje tak buněčnou membránou (Babich and Borenfreund 1990). Lysozomy udržují pH nižší než je v okolní cytoplazmě. Udržování tohoto protonového gradientu na membráně lysozomu je energeticky náročné. Neutrální červeň vstupující do lysozomu získává náboj a proto nemůže prostoupit zpět do cytoplazmy. Ztráta gradientu pH při poškození buňky nebo buněčné smrti způsobí zvýšení propustnosti buněčné membrány a uvolnění zadrženého barviva, případně zabráni jejímu hromadění v lysozomech (Filman et al. 1975). Jako cytotoxický účinek tento test započítává jak lyzi buněk (vliv působení vyšších koncentrací toxických látek), tak depolarizaci membrán jako důsledek snížené produkce ATP (při menším poškození).

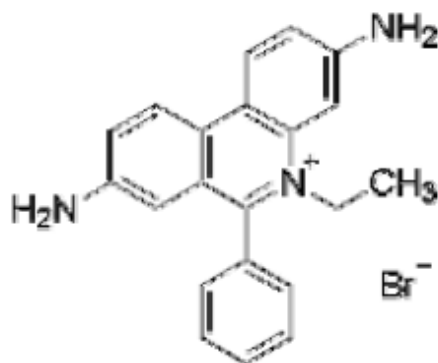
1.2. Metody založené na stanovení propustnosti buněčné membrány.

Monitorování propustnosti buněčné membrány přepokládá barvení mrtvých nebo živých buněk s využitím barviv jako je methylenová modř, neutrální červeň, propidium jodid a dalších. Tyto metody jsou rychlé, výsledky získáme během několika minut. Vyhodnocení můžeme provést mikroskopicky, případně spektrofotometricky.

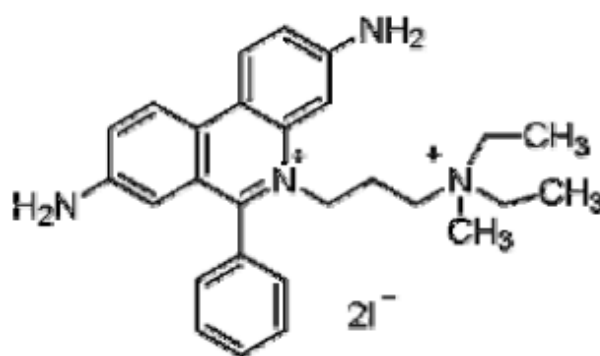
1.2.1. Fluorescenční metody využívající propidium jodid a ethidium bromid

Barviva pro nukleové kyseliny neprostupují do membrány živých buněk a lze je tudíž použít pro detekci mrtvých buněk. Mezi tyto barviva patří ethidium bromid (EtBr), propidium jodid (PI) (Tab 6, Obr. 23-24), a další. Používají se často v kombinaci s nitrobuněčnými substráty esteras, sondami citlivými na membránový potenciál, sondami pro organely nebo indikátory propustnosti membrán.

Zmíněný PI je interkalární barvivo, které neprochází neporušenými membránami živých buněk. Pokud mají buňky cytoplasmatickou membránu porušenu, barvivo volně proudí do buněk. Má vysokou afinitu k nukleovým kyselinám a po vazbě cca 40x větší fluorescenci. Toho se využívá právě ke značení mrtvých buněk (Rode et al., 1998).



Obr. 23 Struktura ethidium bromidu.



Obr. 24 Struktura propidium jodidu.

Tabulka 6b Přehled používaných fluorescenčních sond (King, 2000; Rode et al., 1998; www.sigma-aldrich.com, 15.5. 2007).

	FDA	Calcein AM	BCECF AM	PI	EtBr
Sumární vzorec	C ₂₄ H ₁₆ O ₇	C ₄₈ H ₄₆ N ₂ O ₂₃	C ₃₉ H ₃₈ O ₁₉	C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃
Mr	416,4	994,9	808,7	668,4	394,3
Stanovení	Vitality, viability, cytotoxicity	Vitality, viability, cytotoxicity	Vitality, viability, cytotoxicity	Vitality, viability, cytotoxicity	Vitality, viability, cytotoxicity
Signál	Zelená fluorescence	Zelená fluorescence	Zelená fluorescence	Červená fluorescence	Oranžová Fluorescence
Detekce	Živé buňky	Živé buňky	Živé buňky	Mrtvé buňky	Mrtvé buňky
Výhody	Nenákladný, netoxický	Netoxický, velmi dobře zadržován, relativně nízká citlivost ke změně pH	Netoxický, velmi dobře zadržován	Pomalé vysvěcování	
Nevýhody	Rychlý únik vznikajícího barviva, rychlé vysvěcování, pH citlivá fluorescence	Vysoká cena chemikálie	Vysoká cena chemikálie. Intenzitu fluorescence ovlivňuje intracelulární pH, slábne se vrtústajícím pH	Vysoká toxicita	Toxický
Vlnová délka excit/em [nm]	489/514	494/517	505/545	535/617	518/605

Test dvojitého barvení

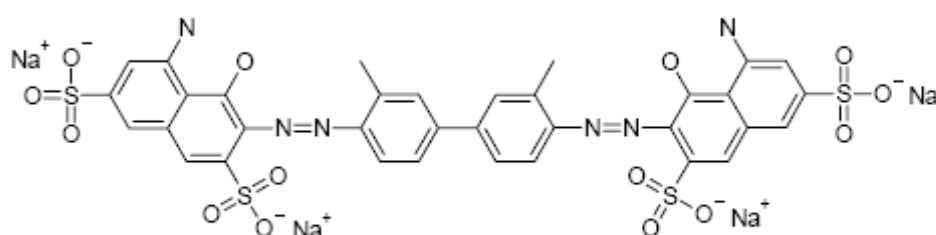
Pro sledování životnosti buněk může být využito barvení buněčné suspenze více fluorescenčními barvivy – např. propidium jodidem (PI) a fluorescein diacetátem (FDA). Barvivo propidium jodid v případě mrtvé buňky proniká přes cytoplasmatickou membránu dovnitř buňky a způsobuje ve fluorescenčním mikroskopu červené fluorescenční zbarvení. Fluorescein diacetát je v živých buňkách štěpen na octan a fluorescein, který vydává zelené fluorescenční zbarvení. Současně se detekují mrtvé a živé buňky.

1.2.2. Laktátdehydrogenasový test

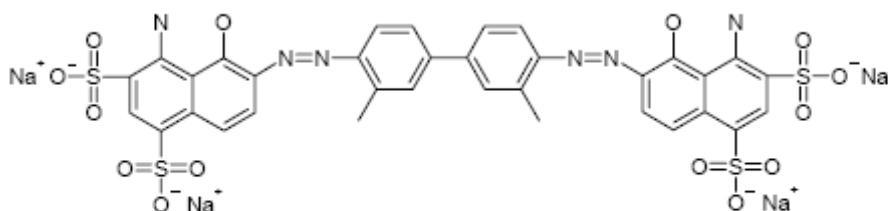
Enzym laktátdehydrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) patří mezi skupinu nádorových markerů, mezi tzv. tkáňové nespecifické antigeny. Jedná se o enzym, který se vyskytuje v řadě živočišných tkání a rostlinných pletiv, jejichž hladinu lze detekovat i za fyziologických podmínek. Při buněčné smrti dochází ke zvýšení permeability buněčné membrány, to má za následek vyplavení enzymu. LDH katalyzuje redukci pyruvátu na laktát (Obr. 25), po vylití enzymu do media je stanovován kvantitativně pomocí chromogenního substrátu. Úbytek NADH, který je nezbytný pro průběh reakce je sledován spektrometricky při 340nm (Bergmeyer & Bernt, 1974). Test není příliš citlivý, neboť k uvolnění LDH dochází až při značné destrukci plazmatické membrány (Harbell et al. 1997).

1.2.3. Kolorimetrické metody využívající barevné sloučeniny trypanovou modř, Evansovu modř, methylenovou modř

Metody stanovení životnosti buněk založené na propustnosti membrán mohou být realizovány detekcí ve viditelném světle barevných látek, které prostupují poškozenou membránou do mrtvých buněk (Tab. 7). Životnost se poté vyhodnotí buď mikroskopicky počítáním mrtvých buněk, nebo spektrofotometricky s využitím mikrodestičkového readeru po odstranění nadbytečného barviva a následném uvolnění barviva z buněk s poškozenou cytoplasmatickou membránou. Příkladem látek barvicích mrtvé buňky jsou např. trypanová modř (TM) (Obr. 26), Evansova modř (EM) (Obr. 27), methylenová modř (MM) (obr. 28), barvivo se dostává do mrtvé buňky (buněčná membrána je poškozena), živá buňka, která má buněčnou membránu nepoškozenou, barvivo nepropouští.



Obr. 26 Struktura trypanové modři.



Obr. 27 Struktura Evansovy modři.

1.3. Metody detekující syntézu DNA jako indikátor růstu

DNA syntéza jako indikátor buněčného růstu je využívána v metodách stanovující jak životnost, tak buněčnou proliferaci. Používají se radioaktivní, např. thymidin tritia (3H)-TdR a neradioaktivní analogy nukleotidů, např. 5-bromo-2'-deoxy-uridin (BrdU) (Obr. 29-30), které jsou přidány k buněčné kultuře a inkorporují se do nově se syntetizující DNA replikujících se buněk. Množství nově syntetizované DNA obsahující (3H)-TdR nebo BrdU je poté kvantifikována. Inkorporovaný BrdU může být detekován imunometodou využívající monoklonální protilátky značené např. enzymem peroxidasou (Rode et al., 1998; Vistica et al., 1991).

1. Kvantifikace živých buněk – spektrofotometrické stanovení

Metoda s FDA (fluorescein diacetát, Fluka 31545, MW = 416,39)

- **zásobní roztok 5 mg/ml acetonu** – rozpipetovat po alikvotech 10 ul do 0,5ml eppendorfek, uchovat v mražáku
 - **pracovní roztok 0,01%** – vždy čerstvý, zředit 50x zásobní roztok do média (u protoplastů 20ul zásobního FDA + 980 ul LM1 média)
 - výsledná koncentrace 20μM FDA (tj. na 100ul buněčné suspenze 10ul pracovního roztoku)
1. K 100 μl buněčné suspenze přidáme 10 μl roztoku FDA v černé destičce
 2. Jako kontroly pipetovat do jamky 100 μl buněčné suspenze +10μl vody a jamku se 100 μl vody a 10 μl pracovního roztoku FDA.
 3. Po 15 min inkubaci v termostatu ve tmě změříme fluorescenci (excitace 490 nm, emise 514 nm)

2. Mikroskopická detekce živých/mrtvých buněk - test dvojího barvení FDA + PI

Zásobní roztoky (uschovat v tmavé lahvičce v aliquotech při -20°C - max. cca 4 měsíce):

FDA – 5mg/ml acetonu

PI – 10mg/ml PBS

Pracovní roztok – připravit těsně před použitím, uchovávat na ledu

0,005 FDA mg/ml (3ul zás. roztoku)

0,05 PI mg/ml (10ul zás. roztoku)

do 10ml DPBS nebo buněčného média

Postup:

- na podložní sklíčko nanést 50ul roztoku
- přidat co nejmenší objem buněčné suspenze – použít ustříženou špičku !!!
- inkubace ve tmě nejméně 3min
- přikrýt krycím sklíčkem a zalepit lakem
- pozorovat fluorescenci – nejdříve zelenou pro FDA (dříve se vysvěcuje)

3.3. Barvení trypanovou modří

Trypanová modř se používá pro barvení mrtvých buněk. Jedná se o derivát toluidinu, který neprochází přes membránu buněk živých, ale prochází membránu buněk mrtvých (nerozlišuje zda se jedná o apoptózu nebo nekrózu).

Mikroskopické stanovení viability v buněčné kultuře

- 1) Připravte si roztok 0,4% trypanové modři v použitém růstovém médiu (navážka 40mg trypanové modři na 10ml)
- 2) Smíchejte vhodný objem buněčné kultury (20-200ul) se stejným objemem 0,4% roztoku trypanové modři

Barvení rostlinných pletiv (listy, listové disky apod.)

Materiál a chemikálie:

Laktofenol: 10 ml kyseliny mléčné, 10 ml glycerolu, 10 g fenolu, 10 ml vody)

70 % glycerol, dest. voda

6-12 jamková destička, vodní lázeň, skalpel

Postup:

- 1) Připravte si barvicí roztok: do 50 mL plastové zkumavky připravte 25 mL roztoku 2,5 mg/mL trypanové modři v laktofenolu, k tomuto roztoku přidejte 2-násobný objem etanolu
- 2) Vložte kousky listů do titračních destiček (6-12-jamkové)
- 3) Pokryjte barvicím roztokem a povařte 1 minutu na vroucí lázni
- 4) Nechte při laboratorní teplotě 1-24 hodin
- 5) Slijte barvicí roztok a listy ponechejte v 70% glycerolu
- 6) Řezy přeneste do kapky 50 % glycerolu na podložním skle a uzavřete krycím sklíčkem

4. STANOVENÍ REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

Společný teoretický úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystavovány působení řady stresových faktorů, které mohou nejen zpomalovat jejich životní funkce, ale také poškozovat jednotlivé orgány a v krajním případě vést až k uhynutí rostliny.

Typickou reakcí rostlin na působení stresových faktorů je tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS). ROS jsou vysoce reaktivní molekuly, které mohou rychle napadnout všechny typy biomolekul a tím narušit metabolismus buňky. Jsou schopny samostatné existence, ale liší se výrazně svým poločasem života (Florence, 1990). Mezi ROS patří singletový kyslík, peroxid vodíku, superoxidový anion-radikál, hydroxylový radikál, hydroxylový ion a perhydroxylový radikál. Největší roli vzhledem k relativně dlouhému poločasu života má peroxid vodíku (H_2O_2). U rostlin se tvoří převážně tyto: singletový kyslík (1O_2), superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), hydroxylový ion (OH^-), perhydroxylový radikál (O_2H^{\cdot}) a peroxid vodíku (H_2O_2).

Tvorba reaktivních forem kyslíku probíhá u všech rostlin, a to i při jejich růstu v optimálních podmínkách. Za normálních růstových podmínek je produkce reaktivních forem kyslíku v buňce nízká, např. v chloroplastu $240 \mu\text{mol/s } O_2^{\cdot-}$ a $0,5 \mu\text{M } H_2O_2$. Působí-li na rostlinu stresové faktory, které naruší její buněčnou homeostázu, dochází k výraznému zvýšení koncentrace ROS v buňce, např. v chloroplastu až $720 \mu\text{mol/s } O_2^{\cdot-}$, $5-15 \mu\text{M } H_2O_2$ (Polle, 2001). Největší množství reaktivních forem kyslíku se v rostlinách tvoří především v chloroplastech, ale nezanedbatelná je produkce v mitochondriích a dalších membránových systémech, a rovněž v buněčné stěně. Tvorba ROS může být podstatně zintenzivněna působením stresových faktorů (Mittler, 2002). Působení stresových faktorů může vyvolat u rostlin oxidativní stres, charakteristický prudkou přechodnou tvorbou velkého množství aktivních forem kyslíku (ROS).

V biologických systémech tedy hrají ROS dvojí roli:

- 1) slouží jako signální molekuli pro expresi genů
- 2) jako toxické meziprodukty aerobního metabolismu způsobují poškození či zánik buňky (oxidativní poškození DNA a RNA, oxidace proteinů, peroxidace nenasycených mastných kyselin)

Produkce ROS	Lokalizace	Typ ROS
Fotosyntéza PSI nebo PSII	Chloroplast	$O_2^{\cdot-}$
Respirace	Mitochondrie	$O_2^{\cdot-}$
Glykolát oxidasa	Peroxisom	H_2O_2
Excitovaný chlorofyl	Chloroplast	$O_2^{\cdot-}$
NADPH oxidasa	Plasmatická membrána	$O_2^{\cdot-}$
β -oxidace mastných kyselin	Peroxisom	H_2O_2
Oxalát oxidasa	Apoplast	H_2O_2
Peroxidasy	Buněčná stěna	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}$
Aminoxidasa	Apoplast	H_2O_2

4.1. Stanovení peroxidu vodíku

Peroxid vodíku je bezbarvá, kapalná látka, jejíž bod varu se pohybuje okolo 115-157 °C a bod tání je nižší než 50°C. Peroxid vodíku může vystupovat jako oxidační činidlo (za vzniku vody), nebo jako redukční činidlo (tvorba kyslíku) jak v kyselém, tak alkalickém prostředí. Peroxid vodíku je poněkud silnější kyselina než voda. Je proto schopen tvořit peroxidy a hydrogenperoxydy (Kašpárek et al., 2001).

H₂O₂ se podobá svou molekulární strukturou vodě a je velice difusibilní uvnitř i mezi buňkami. Proniká skrz aquaporiny dovnitř buňky a spolu se salicylovou kyselinou a oxidem dusnatým aktivuje mnoho rostlinných obranných systémů a podílí se na regulaci exprese určitých genů (Schreck et al., 1991). H₂O₂ v mikromolárních dávkách vykazuje nízkou reaktivitu, ale ve vyšších hladinách (>50 μM) může atakovat buněčné cíle (Cochrane, 1991). Peroxid vodíku je schopný zničit proteiny. Dochází k oxidaci sulfhydrylových skupin na cysteinech s následnou tvorbou disulfidových vazeb, které mohou zasahovat do konformace a funkce proteinu (Radi et al., 1991). Peroxid vodíku také může degradovat nenasycené mastné kyseliny. Tento proces může narušit membránovou strukturu a její propustnost (Scandalios, 1992).

Peroxid vodíku vzniká v živé buňce v průběhu řady metabolických procesů. Zvýšená produkce peroxidu vodíku je spojena s obrannou reakcí rostlin vyvolanou působením stresových faktorů. Peroxid vodíku vystupuje jednak jako signální, ale také jako obranná molekula (Bolwell et al., 1998).

Superoxidový anion-radikál je za katalýzy superoxidodismutasy přeměňován na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je dále produkován v reakcích katalyzovaných aminoxidasami a peroxidasami, lokalizovanými v buněčné stěně. Rostlinné buněčné stěny jsou velmi bohaté na tento typ peroxidas (Bolwell et al., 1995). Peroxid vodíku, tvořící se v blízkosti buněčné stěny, se aktivně účastní procesu lignifikace, jednoho z možných obranných mechanismů rostliny (Mittler, 2002).

Koncentraci peroxidu vodíku lze stanovit řadou metod. Známé jsou metody luminiscenční, nejčastěji používající činidlo luminol, i titrační, mezi které patří jodometrie, manganometrie nebo cerimetrie. Pro detekci v rostlinách se však nejčastěji používají metody spektrofotometrické.

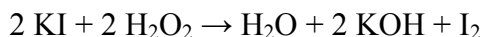
Přehled metod používaných pro stanovení peroxidu vodíku

<u>metody</u>	
<u>titrační</u>	
	jodometrie manganometrie cerimetrie
<u>spektrofotometrické</u>	
	s jodidem draselným s hydrochinonem a anilinem s xylenolovou oranží s Amplex Red s aminoantipyrinem a fenolem s aminoantipyrinem a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonovou kyselinou
<u>luminiscenční</u>	
	s křenovou peroxidasou a luminolem

Spektrofotometrické metody

A. Metoda využívající jodid draselný

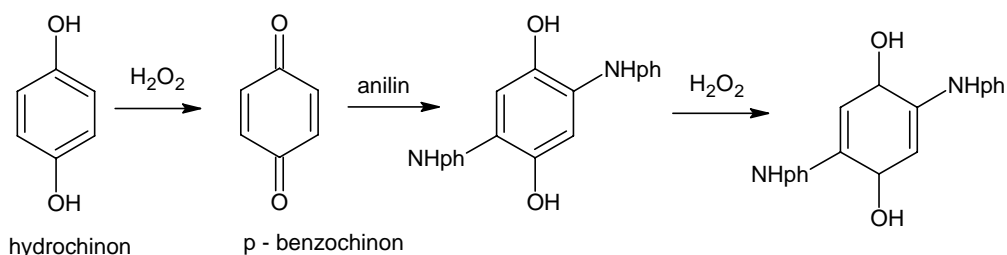
Princip metody spočívá v reakci jodidu draselného s peroxidem vodíku ve stechiometrii 1:1 za tvorby jódu, který lze stanovit měřením absorpance při 390 nm (Klapheck et al., 1990).



Metoda stanovení peroxidu vodíku s využitím jodidu draselného byla modifikována přidavkem škrobu a manganistanu draselného jako katalyzátoru. V tomto případě dochází k posunu vlnové délky, při které je monitorován produkt. Absorbance je detekována při 570 nm. Metoda je lineární do 2,9 $\mu\text{mol/l}$ peroxidu vodíku (Graf & Penniston, 1980). Jedná se o poměrně často používanou metodu při stanovování peroxidu vodíku v rostlinných extraktech, metoda je experimentálně i finančně nenáročná.

B. Metoda s hydrochinonem a anilinem

Princip metody spočívá v reakci hydrochinonu, který se za přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje na *p*-benzochinon. Tento vzniklý meziprodukt dále reaguje s anilinem na konečný produkt, ten je spektrofotometricky měřitelný při 550 nm. Molybdenan amonný zde působí jako katalyzátor. Metoda je lineární do koncentrace 0,4 mM peroxidu vodíku (Elnemma, 2004).

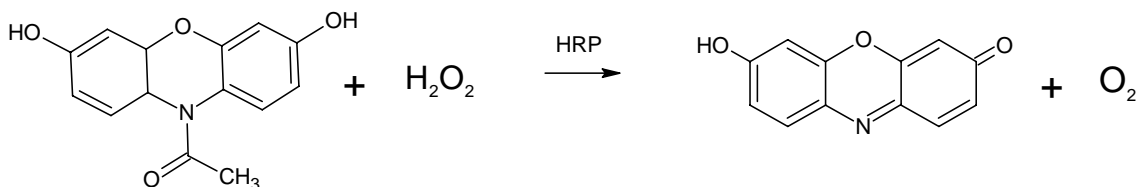


C. Metoda s xylenolovou oranží

Princip metody spočívá v oxidaci železa (II) na železo (III) peroxidem vodíku, za přítomnosti sorbitolu, který funguje jako katalyzátor. Železo (III) vytváří s xylenolovou oranží fialový komplex, který je spektrofotometricky měřitelný při 560 nm. Metoda je lineární do koncentrace 2 μM peroxidu vodíku (Millington & Maurdev, 2004).

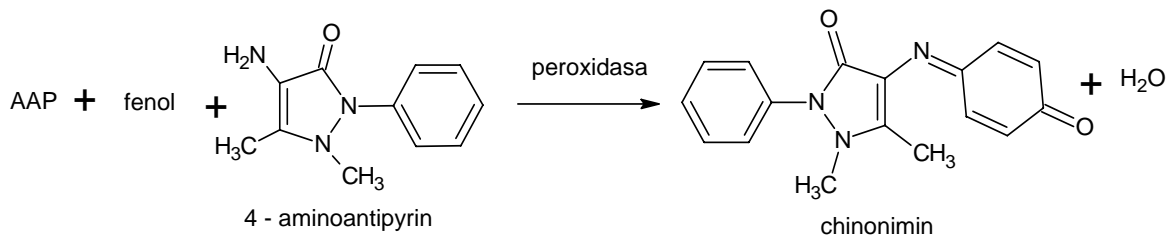
D. Metoda s Amplex Red

Princip metody spočívá v reakci Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) s peroxidem vodíku v přítomnosti peroxidasy ve stechiometrii 1:1 za tvorby resorufinu, který lze stanovit měřením absorpance při 570 nm nebo fluorescence (excitační filtr: 530/25, emisní filtr 590/35). Pro vzorky, které obsahují nízkou koncentraci peroxidu vodíku je vhodné použít fluorescenční měření, které je lineární do 0,004 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku a je citlivější. Naopak při vyšších koncentracích je vhodné použít měření absorpance, tato metoda je lineární do 0,3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace peroxidu vodíku (Zhou et al., 1997).



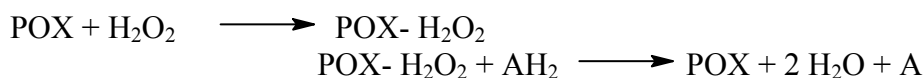
E. Metoda s aminoantipyrinem a fenolem

Princip metody spočívá v reakci aminoantipyrinu s peroxidem vodíku a fenolem za přítomnosti peroxidasy. Barevný produkt této reakce lze stanovit měřením absorbance při 505 nm. Metoda je lineární do koncentrace 6 nM peroxidu vodíku (Seki et al., 2004).



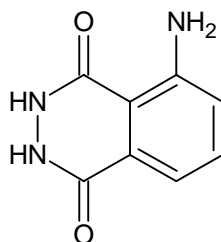
F. Metoda s aminoantipyrinem a 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonovou kyselinou

Princip metody spočívá v reakci oxidovaného aminoantipyrinu s dichlorhydroxybenzensulfonovou kyselinou (DCHBS). Produkt má růžovofialové zbarvení a lze jej stanovit měřením absorbance při 515 nm. Tato metoda se často používá ve spřažené reakci při stanovení diaminooxidase aktivity (Angelini et al., 1995).



Luminiscenční metody

Podstatou chemiluminiscence je zářivá relaxace excitovaných stavů, které byly produkovány exotermní chemickou reakcí (chemiexcitací). Aby mohla chemická reakce vykazovat chemiluminiscenci, musí splňovat řadu kritérií. Musí být dostatečně exotermní, produkt musí fluoreskovat a při reakci musí být preferována tvorba excitovaného stavu. Jednou z nejčastěji používanou metodou monitorování volných radikálů a reaktivních metabolitů je luminiscenční metoda využívající křenovou peroxidasu a luminol. Tato metoda se velmi často používá pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Při rozkladu peroxidu vodíku katalyzovaném křenovou peroxidasou (HRP) dochází ke vzniku reaktivních sloučenin a následné chemiluminiscenci luminolu.



luminol

4.1.1. Stanovení peroxidu v rostlinném extraktu

4.1.1.1.

Chemikálie:

Metoda s Amplex Red:

30% peroxid vodíku – zásobní láhev uložena v ledničce

0,2 mM Amplex Red (10mM Amplex Red (AR), 1,3 mg do eppendorfky, rozpustit v 0,5 ml DMSO, rozpipetovat aliquoty 50 μ L a zamrazit při -20°C)

100 mM K-fosfátový pufr pH 7

0,4 U/ml křenová peroxidasa (navážka 0,2 mg HRP- aktivita cca 550 U/mg, do 15-ml zkumavky, rozpustit v 10 ml zásobního pufru, rozdělit na aliquoty po 0,5 ml a zamrazit na -20°C) v 50 mM Na-fosfátovém pufru pH 7,4 (1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}/\text{L}$; 10,37 g $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ na 1L vody)

Křenová peroxidasa (HRP) (10 U/ml)

Zásobní roztok H_2O_2 5,19 mM (100 μ L 30 % peroxidu doplnit do 100 ml vodou)

Metoda s KI: zásobní roztok: 1M jodid draselný (KI): 16,6 g KI do 100 ml vody

Materiál:

Centrifugační zkumavky, miska s ledem, kádinky, pipety. homogenizační miska s tloučkem, mořský písek, ependorfky, 100 mL odměrná baňka, 10 mL odměrná baňka, 96-jamková deska a 96-jamková destička pro měření v UV oblasti, pipety

Rostlinný materiál: Hrách setý (*Pisum sativum*, cv. Lantra) – zelené a etiolované rostliny –10 denní rostliny pěstované v perlitu ve fytotronu, při konstantní teplotě 21°C a fotoperiodě 15/9 hod den/noc;

Přístroje:

Analytické váhy, digitální předvážky, digitální pH metr, elektromagnetická míchačka, homogenizátor, chlazená centrifuga, mikrodestičkový spektrofotometr.

4.1.1.2. Pracovní postup

Kontrolní stanovení koncentrace zásobního roztoku peroxidu vodíku

1) do jamky na 96-jamkové destičce napipetujte 250 μ L 1000x zředěného roztoku 30 % peroxidu vodíku

2) změřte absorbanci peroxidu při 240 nm, jako blank použijte deionizovanou vodu (destičky pro měření v UV oblasti)

3) určete přesnou koncentraci zásobního roztoku peroxidu vodíku ($\epsilon = 0,0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Extrakce – zpracování rostlinného materiálu

1. Testovaný rostlinný materiál homogenizujeme ve 100 mM K-fosfátovém pufru, pH 7 v poměru 1:2 (w:v).
2. Homogenáty napipetujeme do mikrozkuvek a centrifugujeme 15 min při 15 000 otáčkách/min, při teplotě 4°C .
3. Pro získání čistého extraktu centrifugaci opakujeme 2 x v 10 min intervalech.

Stanovení peroxidu vodíku metodou s KI

- 1) nachystejte kalibrační řadu peroxidu vodíku, řed'te TCA, standardy 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM peroxid vodíku (metoda lineární v rozsahu koncentrací H_2O_2 1-50 μM) (5,19 mM zásobní roztok)
- 2) na 96-jamkovou destičku napipetujte v tripletu do jamek 50 μL standardu, Blanku (TCA) nebo 50 μL vzorku
- 3) přidejte 100 μL 1M KI (celkový objem reakční směsi 150 μL)
- 4) nechte inkubovat 20 minut
- 5) změřte absorbanci při 390 nm

Stanovení koncentrace peroxidu vodíku metodou s Amplex Red

Stanovení peroxidu vodíku metodou s Amplex Red (potřebuje úzké rozmezí pH 7-8)

A) měření absorbance:

- 1) Nachystejte si kalibrační řadu peroxidu vodíku – standardy 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 μM H_2O_2 (0,5 – 100 μM) – viz tabulka přiložená níže
- 2) Připravte reakční činidlo: 50 μL zásobního roztoku 10 mM Amplex Red (AR)
100 μL zásobního roztoku 10 U/ml křenové peroxidasy (HRP)
4,85 ml zásobního pufru
- 1) Na 96-jamkovou destičku napipetujte v tripletu do jamek 50 μL standardu, vzorku nebo blanku (zásobní pufr)
- 2) Přidejte 50 μL reakčního činidla
- 3) Nechte 10 minut inkubovat
- 4) Změřte absorbanci při 570 nm

Tab. 8 příprava peroxidu vodíku o různé koncentraci pro stanovení kalibrační křivky.

Jamka	Koncentrace H_2O_2 (μM)	Destilovaná voda (μl)	10 μM H_2O_2 (μl)
A	0	50	0
B	0,1	49,5	0,5
C	0,5	47,5	2,5
D	1	45	5
E	3	35	15
F	5	25	25
G	7,5	12,5	37,5
h	10	0	50

B) měření fluorescence:

- 1) Nachystejte si kalibrační řadu peroxidu vodíku – standardy 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 μM H_2O_2 (metoda lineární pro 0,01 – 5 μM)
- 2) Reakční činidlo stejné jako v bodě A)
- 3) Na černou 96-jamkovou destičku napipetujte v tripletu do jamek 50 μL standardu, vzorku nebo blanku (zásobní pufr)
- 2) Přidejte 50 μL reakčního činidla
- 3) Nechte 10 minut inkubovat ve tmě
- 4) Změřte fluorescenci, excitační filtr 530/25, emisní filtr 590/35

4.1.1.2. Vyhodnocení výsledků

1. Vynesení absorbancí kalibračních standardů proti koncentraci peroxidu vodíku vytvoříme kalibrační graf.
2. Interpolací určíme koncentraci peroxidu vodíku ve vzorku. Výsledný obsah peroxidu vodíku vztáhneme na g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu (fw) a dále uvádíme v jednotkách nmol/g fw.
3. V případě sledování časového nebo koncentračního vlivu zvoleného stresového faktoru vypracujeme graf s příslušnou závislostí změn produkce H_2O_2 na sledovaných parametrech.

4.1.3 Kontrolní otázky

1. Jaké znáte reaktivní formy kyslíku?
2. Vysvětlíte principy stanovení koncentrace peroxidu vodíku používané v dané úloze.
3. Jaké znáte metody pro stanovení koncentrace peroxidu vodíku?
4. Kdy dochází ke zvýšení hladiny ros u rostlin? Jakou roli může mít peroxid vodíku v obranné reakci rostlin?

5. STANOVENÍ OXIDU DUSNATÉHO A REAKTIVNÍCH FOREM DUSÍKU

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).

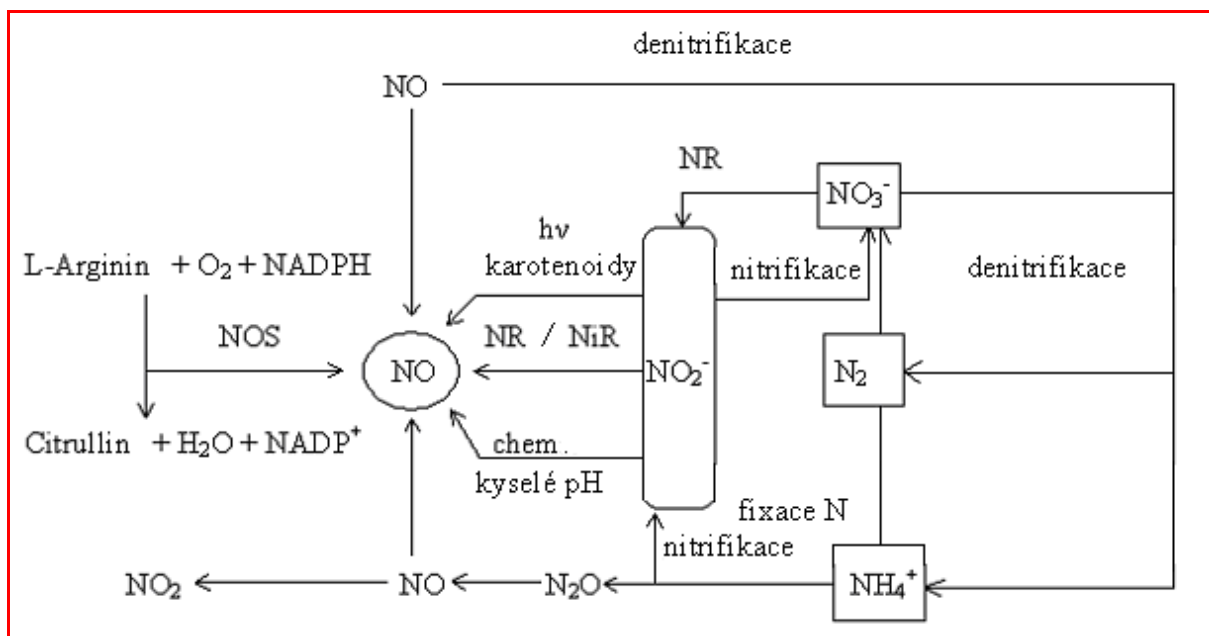
NO je velmi rozšířeným vnitrobuněčným a mezibuněčným poslem se širokým spektrem regulačních funkcí mnoha fyziologických i patologických procesů (Wendehenne et al., 2001, Lamattina et al., 2003, Neill et al., 2003, del Río et al., 2004). Znalosti funkcí NO v rostlinných systémech jsou ve srovnání s živočišnými 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 ranných 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 O_2^- , kdy dochází ke tvorbě velmi reaktivního peroxynitritového aniontu (ONOO⁻), který poškozují 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^-) (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 druh oxidu 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 synthasami (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 NOS a neuronální NOS 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 (Kavva et al., 2006).

V posledním desetiletí hledalo mnoho rostlinných biologů analogický enzym produkující NO reakčním mechanismem obdobným NO synthasám 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. 13).



Obr. 13 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 bohatější, což omezuje použití celé řady metod a interpretaci získaných hodnot. Pro stanovení produkce NO lze použít specifické sondy na bázi derivátů diaminonafthalenu, diaminofluoresceinu 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.

Pro měření aktivity synthasy oxidu dusnatého se v případě nízkých aktivit používá metoda využívající radioaktivně značený substrát [14C]-L-arginin, při které se stanovuje množství značeného produktu L-citrullinu po separaci na kolonce katexu. Tato metoda ovšem opět vyžaduje specializované přístrojové vybavení a navíc není pro využití radioaktivního materiálu vhodná pro studentské vědecké práce. Alternativně je možno sledovat tvorbu citrullinu v reakční směsi spektrofotometrickými metodami, které dosahují řádově cca μM citlivosti. Často využívanou metodou stanovení aktivity NO synthasy je oxyhemoglobinová metoda, založená na reakci NO s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu.

5.1. Griessova metoda stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů

5.1.1. Teoretický úvod

Griessova metoda je nepřímá kolorimetrická metoda pro stanovení dusitanů a dusičnanů, které vznikají reakcí NO s kyslíkem nebo superoxidem. Principem metody je tvorba diazoniové soli (reakcí dusitanů se sulfanilamidem) v kyselém prostředí a její následná kopulace s N-(1-naftylethylen)diaminem (NED) za tvorby azobarviva s $\lambda_{\max} = 543$ nm. Dusičnany je třeba nejprve převést na dusitany redukcí kovem, např. trojmocným vanadem, kadmíem nebo enzymaticky pomocí bakteriální nitrátreduktasy. Tato metoda je vhodná pro měření dusitanů v mikromolárních koncentracích (Miranda et al., 2001).

5.1.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

1 mM standardy NaNO_2 a NaNO_3 , aprotonin, neionizovaná voda, dithiotreitol (DTT), EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová), glycerol, HEPES, PMSF (fenylmethylsulfonyl fluorid), PVPP (polyvinylpoly-pyrrolidon),

Griessovo činidlo A (1% sulfanilamid v 5% kyselině fosforečné)

Griessovo činidlo B (0,1% N-(1-naftylethylen)diamin (NED))

Roztok VCl_3 (navážka 40 mg na 5 ml 1M HCl).

Materiál:

Centrifugační zkumavky, homogenizační zkumavky, kádinky, mikrotitrační destička, miska s ledem, pipety.

Přístroje:

Analytické váhy, digitální předvážky, digitální pH metr, elektromagnetická míchačka, homogenizátor, chlazená centrifuga, mikrodestičkový spektrofotometr, termostat.

5.1.3. Pracovní postup

5.1.3.1. Příprava rostlinných extraktů pro stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů

1. Pro extrakci použijeme zásobní pufr obsahující 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,5% PVPP a 10% glycerol, do kterého těsně před extrakcí přidáme DTT (výsledná koncentrace 5 mM), aprotonin (výsledná koncentrace 2 mM) a PMSF (výsledná koncentrace 2 mM) (Chandok et al., 2003).
2. Extrakci provedeme homogenizací testovaného rostlinného materiálu s extrakčním puffrem v poměru 1:2 (w:v) s využitím automatického homogenizátoru (homogenizace 2 x 15 s při intenzitě 6,5 m/s s pětiminutovým mezichlazením).
3. Homogenát centrifugujeme po dobu 10 min při 13200 otáčkách/min a teplotě 4 °C.
4. Supernatant znovu centrifugujeme za stejných podmínek.
5. Veškerou manipulaci s extrakty provádíme při chlazení v ledové lázni.

5.1.3.2. Stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů

Spektrofotometrické stanovení dusitanů a dusičnanů provedeme s využitím mikrodestičkového readeru při vlnové délce 540 nm.

1. Roztoky o různé koncentraci dusičnanů a dusitanů se připraví podle tabulky č. 7 ředěním zásobního standardního roztoku dusitanu nebo dusičnanu.
2. a)
 - Při stanovení obsahu dusitanů pipetujeme do jamek destičky 50 μl extrakčního pufru (blank), standardu NO_2^- (tab. 7) a vzorku, vše ve dvojnásobném opakování.
 - K blanku, standardům a vzorkům následně přidáme 50 μl deionizované vody a 100 μl Griessova činidla (roztoky Griessova činidla A a B smíchané v poměru 1:1).
 - Destičku se všemi komponenty po promíchání ponecháme 1 h ve tmě při laboratorní teplotě.
2. b)

- Obsah dusičnanů stanovíme po jejich redukci na dusitany pomocí $VdCl_3$ z celkového detekovaného obsahu dusitanů v extraktech.
 - Do jamek destičky opět pipetujeme 50 μ l extrakčního pufru (blanku), standardu NO_3^- (tab. 7) a vzorku, vše ve dvojitěm opakování.
 - K blanku, standardům a vzorkům následně přidáme 50 μ l roztoku Griessova činidla A, 50 μ l roztoku $VdCl_3$ a 50 μ l roztoku Griessova činidla B.
 - Destičku se všemi komponenty po promíchání ponecháme 3 h v inkubátoru při 45 °C.
3. Měříme absorbanci vzorků při vlnové délce 540 nm.

Tab. 7 Příprava kalibrační řady dusitanů a dusičnanů.

Jamka	Koncentrace NO_2^- (μ M)	Destilovaná voda (μ l)	NO_2^- 1 mM (μ l)	Koncentrace NO_3^- (μ M)	Destilovaná voda (μ l)	NO_3^- 1 mM (μ l)
A	0	50	0	0	50	0
B	10	49,5	0,5	20	49	1
C	20	49	1	50	47,5	2,5
D	30	48,5	1,5	100	45	5
E	40	48	2	200	40	10
F	50	47,5	2,5	300	35	15
G	80	46	4	400	30	20
H	100	45	5	500	25	25

5.1.4. Vyhodnocení výsledků

1. Vynesením absorbancí kalibračních standardů proti koncentraci dusitanu nebo dusičnanu vytvoříme kalibrační grafy.
2. Interpolací určíme koncentrace dusitanu a dusičnanu ve vzorku. Jejich výsledný obsah vztáhneme na g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu (FW) a dále uvádíme v jednotkách μ g/g FW.

5.1.5. Kontrolní otázky

1. Jaký je význam dusitanů případně dusičnanů v rostlinách?
2. Jak probíhá metabolismus dusičnanů u rostlin?
3. Jaký je princip metody stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů použité v této úloze?
4. Proč při stanovování koncentrace dusičnanů přidáváme do reakční směsi VCl_3 ?

5.2. Stanovení produkce NO oxyhemoglobinovou metodou

5.2.1. Teoretický úvod

Pro stanovení produkce NO se používá velmi často oxyhemoglobinová metoda. Tato metoda je založena na reakci oxyhemoglobinu ($oxyHb$, Fe^{2+}) se vznikajícím NO za tvorby methemoglobinu ($metHb$, Fe^{3+}) a dusičnanu. Nárůst absorbance v čase je důsledkem konverze $oxyHb$ na $metHb$, jejíž rychlost (intenzita) je přímo úměrná množství vznikajícího NO. Maximální citlivost stanovení je zaručena výběrem vhodné vlnové délky, při které je rozdíl mezi absorbancí $oxyHb$ a $metHb$ největší, tj. 401 nm (Hevel & Marletta, 1994). Množství vzniklého NO lze určit z příslušných spektrálních změn oxy /methemoglobin s detekčním limitem cca 10 nM. Oxyhemoglobinovou metodu lze použít pro stanovení NOS-like aktivity u rostlin.

5.2.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

2 U/ μ l SOD, 20 U/5 μ l CAT, 1 mM kalmodulin, 8 mM H₄B, 10 mM FAD, 10 mM FMN, dithiotreitol (DTT), 20 mM K-fosfátový pufr pH 7, 50 mM L-Arginin, 50 mM Nor-Valin, 100 mM CaCl₂, aminoguanidin, aprotonin, hovězí hemoglobin, dithioničitan sodný, EDTA, glycerol, HEPES, L-NAME, NaOH, NADPH, octan hořečnatý, PMSF, PTIO, PVPP.

Materiál:

Centrifugační zkumavky, dialyzační střevo, homogenizační zkumavky, kádinky, kolona Sephadex G-25, mikrotitrační destička, miska s ledem, pipety.

Přístroje:

Akvarijní motorek, analytické váhy, digitální předvážky, digitální pH metr, elektromagnetická míchačka, homogenizátor, chlazená centrifuga, mikrodestičkový spektrofotometr.

Roztoky:

Pufr pro extrakci: 20 mM HEPES (navážka HEPES 476 mg/100 ml) s 2 mM EDTA (navážka Na⁺-EDTA 58 mg/100 ml), 0,5% PVPP (polyvinyl(polypyrolidon) – navážka 0,5 mg/100 ml), 10% glycerol (10 g/100 ml – dávkovat na předvážkách)

Pufr pro měření aktivity NOS: 100 mM HEPES (2,38 g/100 ml) s 1 mM octan hořečnatý (21 mg/100 ml), odměřte přibližně $\frac{3}{4}$ množství deionizované vody, poté upravte pH pomocí konc. NaOH na 7,5 a dolijte vodu po rysku.

Chemikálie pro metodu oxyHb a DAF-2: (všechny roztoky kromě FAD a FMN se připravují v zásobním pufru, roztoky ponechte celou dobu na ledové lázni)

Superoxidismutasa (SOD) - aktivita 2 U/ μ l reakčního pufru (navážka 0,4 mg SOD na 2ml pufru),

katalasa (CAT) - aktivita 20 U/5 μ l reakčního pufru (navážka 20 mg CAT na 2 ml pufru),
Oxyhemoglobin (cca 80 μ M oxyHb - Human A_o ferrous, navážka 5 mg/1,5 ml, případně připravený oxyHb)

100 mM CaCl₂ (na 10 ml navážka 147 mg CaCl₂ . 2 H₂O)

50 mM L-Arginin - L-Arg (1,05 g/100 ml),

50 mM Nor-Valin - Nor-Val (0,6 g/100 ml),

10 mM FAD (4,2 mg/500 μ l H₂O),

10 mM FMN (2,4 mg/500 μ l H₂O),

1 mM calmodulin (MW cca 17 kDa, preparát celkem 60 μ g rozpuštěn v 3,53 ml)

5.2.3. Pracovní postup

5.2.3.1. Příprava oxyhemoglobinu

1. Kolonu Sephadex G-25 equilubrujeme připraveným 20 mM K-fosfátovým pufrům, pH 7 obsahujícím 1 mM EDTA.
2. Na kolonu nanese 300 mg dithioničitanu sodného rozpuštěného ve 2 ml pufru a necháme ho vsáknout do gelu.
3. Poté nanese 1 ml pufru a necháme opět vsáknout do gelu.
4. Na závěr nanese na kolonu 150 mg hovězího hemoglobinu rozpuštěného v 5 ml pufru.

5. Do kádinky zachytíme sytě rudý eluát, který potom probubláváme 10 min vzduchem z akvarijního motorku s ustřiženou špičkou, která není zcela ponořena do roztoku. Pozor, roztok velmi pěnění!
6. Poté preparát dialyzujeme cca 8 h ve vychlazeném pufru nasyceném kyslíkem.
7. Koncentraci připraveného oxyhemoglobinu ověříme měřením jeho absorbance při 560, 576 a 630 nm oproti pufru. Koncentraci potom vypočítáme podle vzorce:

$$\text{oxyHb } (\mu\text{M}) = (1,013 A_{576} - 0,327 A_{630} - 0,7353 A_{560}) \times 10^{-2}$$
8. Obvyklé hodnoty koncentrace oxyhemoglobinu jsou cca 3 μM pro 5x ředěný preparát, tj. 15 μM oxyHb v získaném preparátu.

5.2.3.2. Příprava rostlinných extraktů pro měření NOS-like aktivity

1. Pro extrakci použijeme zásobní pufr obsahující 20 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,5% PVPP a 10% glycerol, do kterého těsně před extrakcí přidáme DTT (výsledná koncentrace 5 mM), aprotonin (výsledná koncentrace 2 mM) a PMSF (výsledná koncentrace 2 mM), PEFABLOC - 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochlorid (23,97 mg, výsledná koncentrace 1 mM).
2. Extrakci provedeme homogenizací testovaného rostlinného materiálu s extrakčním pufrům v poměru 1:2 (w:v) s využitím automatického homogenizátoru (homogenizace 2 x 15 s při intenzitě 6,5 m/s s pětiminutovým mezichlazením).
3. Homogenát centrifugujeme po dobu 10 min při 13200 otáčkách/min a teplotě 4 °C.
4. Supernatant znovu centrifugujeme za stejných podmínek. Veškerou manipulaci s extrakty provádíme při chlazení v ledové lázni.

5.2.3.3. Stanovení změn produkce NO (NOS-like aktivity)

Změnu produkce NO v rostlinném materiálu stanovíme pomocí nepřímé metody s využitím připraveného oxyhemoglobinu.

1. Příprava zásobního pufru: 100 mM HEPES s obsahem 1 mM octanu hořečnatého, pH 7,5 (pH upravíme pomocí koncentrovaného NaOH).
2. Příprava reakčního pufru (připravujeme vždy čerstvý): k 10 ml zásobního pufru přidáme 1 mg DTT, 100 μl 100 mM roztoku CaCl_2 v zásobním pufru, 200 μl 50 mM L-Arg, 200 μl 50 mM Nor-Val, 10 μl 10 mM FAD, 10 μl 10 mM FMN a 10 μl 1 mM kalmodulinu.
3. Příprava roztoku NADPH (připravujeme vždy čerstvý): k 1 ml 1 mM NADPH (0,55 mg/1 ml) v zásobním pufru přidáme 10 μl 8 mM roztoku H_4B a 100 mM DTT v zásobním pufru.
4. Ředění oxyHb - 80 μM oxyHb je nutné 5x naředit pomocí reakčního pufru (s FAD, Arg, Nor-Val, DTT). Pokud bude absorbance blanku a vzorku příliš vysoká, je nutno oxyHb naředit více.
5. Příprava reakční směsi v jedné jamce: 100 μl reakčního pufru, 5 μl CAT, 5 μl SOD, 30 μl oxyhemoglobinu a 30 μl roztoku NADPH.
6. Vlastní stanovení změn produkce NO: Reakci startujeme přidávkem 50 μl vzorku (jako blank použijeme 50 μl reakčního pufru). Nárůst absorbance při vlnové délce 401 nm zaznamenáváme po 10 min (s intervaly detekce po 30 s). Každé stanovení opakujeme 3x.

5.2.3.4. Potvrzení produkce NO enzymem s NOS like aktivitou

1. 200 μl získaného extraktu (7.2.3.2.) napipetujeme do eppendorfky a 10 min povaříme (100 °C).
2. K 200 μl získaného extraktu připipetujeme lapač NO (PTIO), a 2 inhibitory NOS (L-NAME a aminoguanidin), tak aby výsledná koncentrace v reakční směsi byla: 1 mM PTIO, 1 mM L-NAME a 5 mM aminoguanidin. 5 min inkubujeme.
3. Změříme změnu produkce NO v extraktu, v povařeném extraktu a v extraktu s přidávkem lapače NO a inhibitorů NOS pomocí oxyhemoglobinové metody (viz 7.2.3.3.).

5.2.4. Vyhodnocení výsledků

1. Do tabulky zapíšete hodnoty absorbance při 560, 576 a 630 nm změřené při stanovení koncentrace připraveného oxyhemoglobinu a jeho výslednou koncentraci.
2. V tabulce uvedeme k jednotlivým vzorkům absorbance naměřené při 401 nm, průměrnou hodnotu, přepočtenou na koncentraci NO, přepočtenou na koncentraci NO/g FW.
3. V případě sledování časového nebo koncentračního vlivu zvoleného stresového faktoru vypracujeme graf s příslušnou závislostí změny produkce NO na sledovaných parametrech.
4. Přehledně v tabulce uvedeme NOS-like aktivitu v prostředí bez a s lapačem NO, inhibitory NOS a po vystavení extraktu působení vyšší teploty.

Tvorba metHb z oxyHb je provázána nárůstem absorbance, ale extinkční koeficient se mění podle poměru met-oxyHb. Nejlepší aproximace je $\epsilon_{401} = 60000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} [A_{401(\text{metHb})} - A_{401(\text{oxyHb})}]$.

Podle následující rovnice vypočítejte celkovou aktivitu enzymu NOS:

$$\Delta n / \Delta t = (V / \epsilon \cdot l) \cdot (\Delta A / \Delta t)$$

kde $\Delta n / \Delta t$ = aktivita v kat,

V = celkový objem směsi v l,

ϵ = absorpční koeficient v $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$,

l = délka optické dráhy,

ΔA = změna absorbance,

Δt = časový interval v s.

5.3. Aktivita NOS - metoda s 2,3-diaminofluoresceinem (DAF-2)

Pro měření je nutno připravit roztok DAF-2:

Z výchozí koncentrace 5 mM roztoku DAF-2 v DMSO (dimethyl sulfoxid) připravte roztok o koncentraci 0,1 mM (ředit zásobním pufrům pro měření aktivity!!!). Z něj pak připravte roztok o koncentraci 7,3 μM , který pipetujete do jamky. Výsledná koncentrace DAF-2 v jamce je 1 μM . Připravte vždy 1 ml těchto roztoků. Je nutno vše spočítat.

Měření aktivity NOS provádějte v destičkách určených pro měření fluorescence (černé), celkový objem v jamce je 220 μl , do jamky napipetujte látky v uvedeném pořadí!!!

100 μl pufru (HEPES, Mg^{2+} , DTT, Ca^{2+} , L-Arg, Nor-Val, FAD, FMN, calmodulin), u jednoho blanku použijte reakční pufr bez L-Arg

5 μl CAT

5 μl SOD

30 μl 7,3 μM DAF-2

30 μl NADPH + H_4B (v jednom blanku bude chybět)

Reakci startujte přidáním 50 μl vzorku (v jednom blanku použijte místo vzorku extrakční pufr). Budete mít tedy sérii 3 různých blanků a vzorek (vždy ve 3 opakováních).

Flourescence se měří při excitační vlnové délce 485/20 a emisní vlnové délce 516/20 a senzitivitě 70 v 30 s intervalech po dobu 20 min.

5.4. Kontrolní otázky

1. Jaký je princip oxyhemoglobinové metody?
2. Při které vlnové délce je rozdíl mezi absorbancí oxyHb a metHb největší?
3. Které enzymy se mohou podílet na produkci NO u rostlin?
4. Jaké znáte kofaktory NOS-like enzymu?

Literatura

Hevel J. M., Marletta M. A. (1994) Nitric-Oxide Synthase Assays, Meth. Enzymol. 233, 250-8.

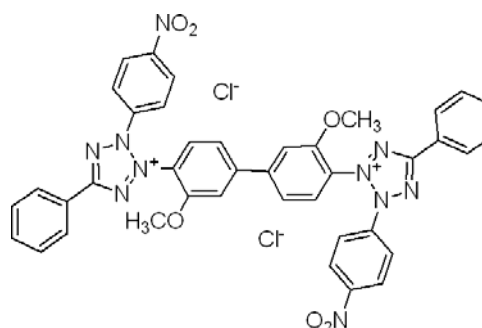
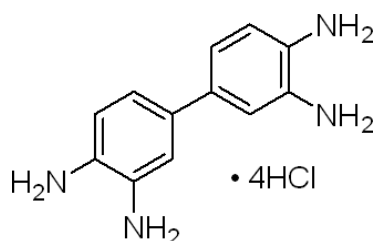
6. Lokalizace produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku

6.1. Lokalizace peroxidu vodíku metodou DAB a superoxidu metodou NBT

(podle Driever et al. 2009, Plant Signal Transduction Methods and Protocols)

Principem detekce peroxidu je reakce 3,3'-diaminobenzidinu (DAB) s peroxidem vodíku katalyzovaná rostlinnými peroxidasami. Polymerací oxidovaného DAB vzniká stabilní hnědý produkt nerozpustný v alkoholu, který se během odbarvení chlorofylu před mikroskopováním řezů z rostlinných pletiv nevyplaví.

Pro detekci superoxidu se používá tetrazoliová modř (nitroblue tetrazolium chlorid, NBT). Ten se jako rozpustná sloučenina dostává do buňky, kde redukuje superoxidem na nerozpustný tmavě modrý formazan, který se ukládá v cytoplasmě jako nerozpustná sraženina.



Materiál a chemikálie:

23mM DAB (3,3'-diaminobenzidin, MW=214,27, navážka 4,9mg/ml dH₂O), pH upravit přidavkem HCl na 3,8 (pozor: roztok DAB je nestálý a citlivý na světlo – připravený roztok přechovávejte ve tmě!)

6mM NBT (nitroblue tetrazolium, MW=817,64; navážka 4,9mg/ml – rozpustit v 50ul metanolu a doplnit vodou na 1ml) – roztok NBT je stálý několik dní v ledničce při 4oC
Kyselina askorbová

Odbarvovací roztok – etanol : kys. mléčná : glycerol 4:1:1

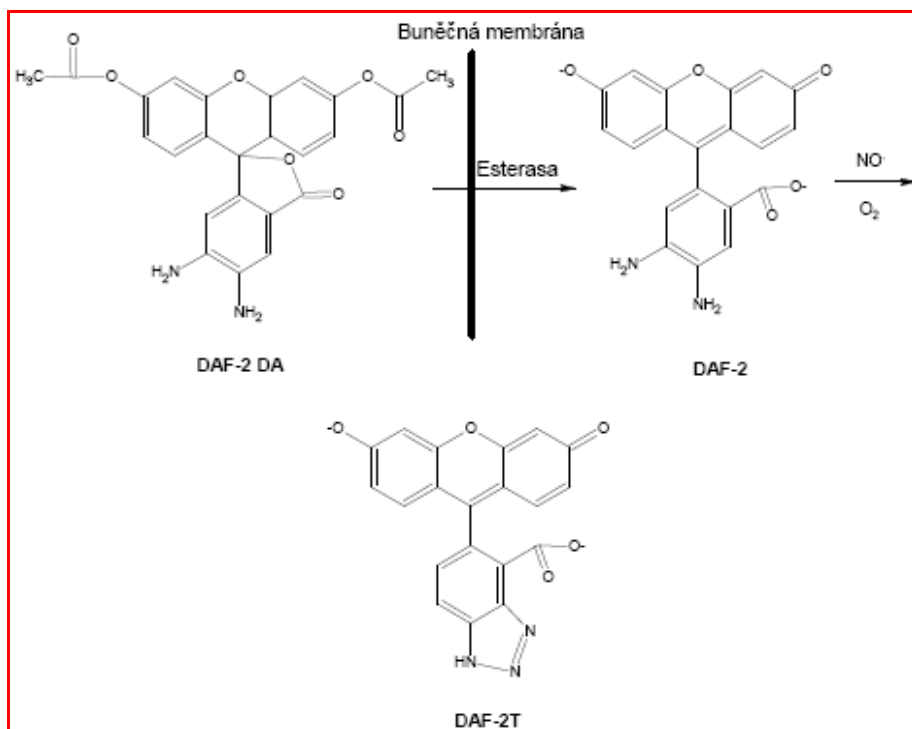
Postup:

- 1) Připravte si čerstvé roztoky DAB a NBT
- 2) Rostlinný materiál ponořte do roztoku DAB nebo NBT, vložte na 5min pod vakuum pro zvýšení infiltrace roztoku do pletiv a nechte inkubovat 2-8 hod – negativní kontrola se inkubuje s přidavkem kys. askorbové ve finální koncentraci 10 mM
- 3) Po ukončení inkubace listy opláchněte v destilované vodě
- 4) Pro odbarvení listy vložte na 20 minut do odbarvovacího roztoku při 80°C
- 5) Odbarvené listy uschovejte v roztoku glycerolu a pozorujte pod mikroskopem – přítomnost peroxidu se sleduje jako červenohnědé zbarvení, přítomnost superoxidu jako tmavomodrá barva.

6.3 Lokalizace produkce reaktivních forem dusíku a kyslíku s využitím fluorescenčních sond

6.3.1. Teoretický úvod

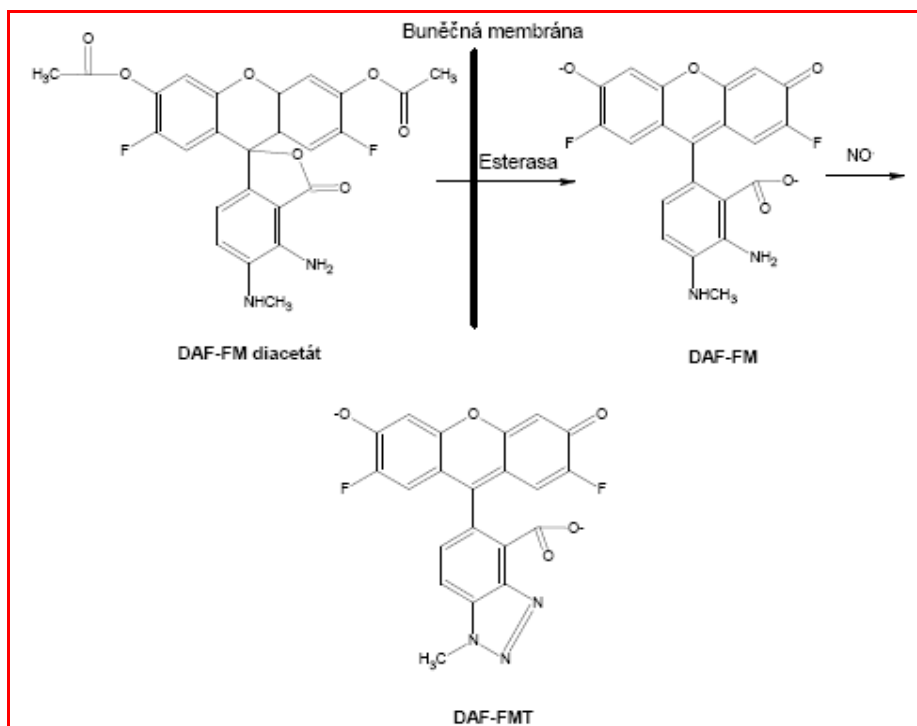
Pro detekci NO se používá řada fluorescenčních sond. Nejčastěji používaný indikátor intracelulárního NO je 4,5-diaminofluorescein diacetát (DAF-2 DA). Sonda lehce prochází přes membránu, kde je následně deacetylována esterasy na 4,5-diaminofluorescein (obr. 14). Po reakci s NO je detekován fluorescenční signál ($\lambda_{exc.}$ - 495 nm, $\lambda_{em.}$ - 515 nm). Detekční limit DAF-2 DA pro NO je ~5 nM (Kojima et al., 1999).



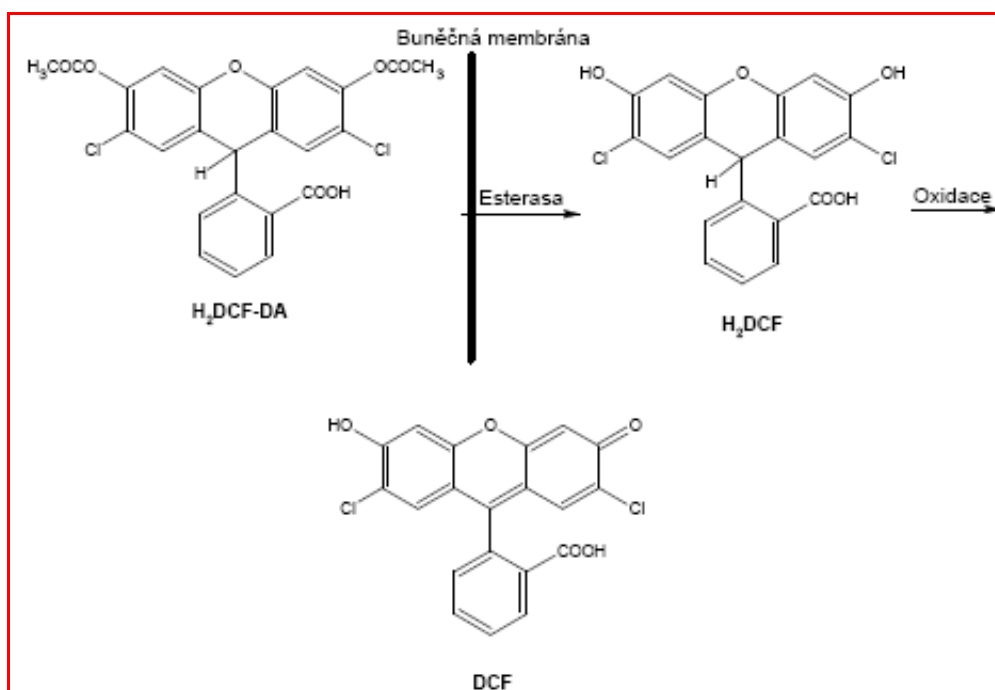
Obr. 14 Reakce fluorescenční sondy DAF-2 DA.

Další používanou sondou je 4-amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) (obr. 15), který reaguje podobně jako DAF-2 DA. Po reakci s NO je detekován fluorescenční signál ($\lambda_{exc.}$ - 495 nm, $\lambda_{em.}$ - 515 nm). DAF-FM je naproti DAF-2 fotostabilnější, detekční limit pro NO je ~3 nM (Kojima et al., 1998).

Pro detekci RNS a ROS se používá fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H₂DCF DA), která má schopnost procházet skrz buněčné membrány, esterasy H₂DCF DA přeměňují na H₂DCF, které se oxiduje pomocí H₂O₂, HO[•], ROO[•], [•]NO a NOO⁻ na fluorescenční DCF (obr. 16). Po reakci je detekován fluorescenční signál ($\lambda_{exc.}$ - 498 nm, $\lambda_{em.}$ - 522 nm) (Kojima et al., 1999).



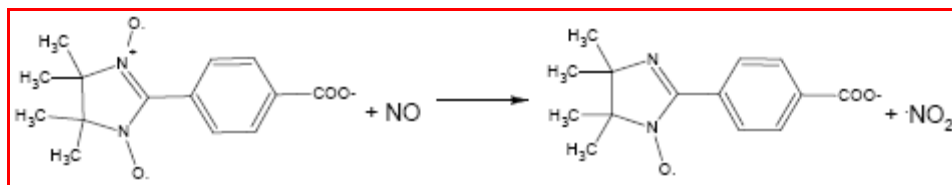
Obr. 15 Reakce fluorescenční sondy DAF-FM DA.



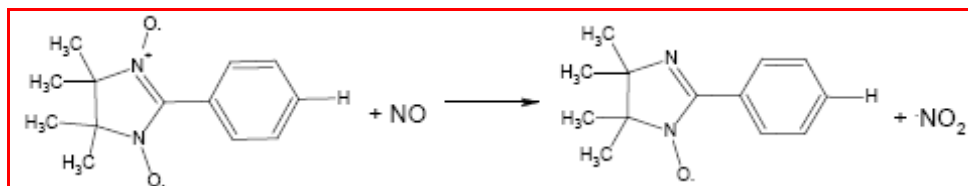
Obr. 16 Reakce fluorescenční sondy H₂DCF DA.

Histochemické stanovení NO pomocí fluorescenční sondy je nutné vždy ověřit detekcí v prostředí s lapači NO. Jako lapač NO se používá 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid (PTIO) (obr.17) a jeho deriváty, např. carboxy-PTIO (2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxid) (cPTIO) (obr. 18). cPTIO stechiometricky reaguje s NO, redukuje jeho akumulaci v buňce. Tím tedy inhibuje fyziologické efekty

způsobené NO (Goldstein et al., 2003). PTIO stochiometricky reaguje s NO (obr. 17), ale neovlivňuje funkci NOS (Goldstein et al., 2003).



Obr. 17 Reakce PTIO.



Obr. 18 Reakce cPTIO.

POSTUP PRO BUŇKY

6.3.2. Materiál, chemikálie a přístroje

5 mM DAF-FM DA v DMSO

5 mM H₂DCF DA v DMSO

LCM1 médium

0,1 M HEPES s obsahem 1 mM MgSO₄, pH 7,5 (pH upravíme pomocí NaOH).

Materiál: Kádinky, mikrotitrační destička, pipety.

Přístroje: Mikrodestičkový spektrofotometr.

6.3.3.1. Detekce produkce NO pomocí fluorescenční sondy DAF-FM DA v protoplastech

- 1) Připravíme si vždy čerstvý roztok 0,2 mM DAF-FM DA naředěním zásobního 5mM roztoku pufrům 0,1 M HEPES, pH 7,5. Roztok uchovááme ve tmě.
- 2) Do jamky destičky pro měření fluorescence pipetujeme 100 μ l buněčné suspenze nebo 100 μ l LCM1 média (blank)
- 3) Přidáme 5 μ l čerstvě připravené 0,2 mM DAF-FM DA
- 4) Změříme fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) okamžitě po přidavku DAF-FM DA a po 1 h inkubaci buněk s detekční sondou. Každé stanovení opakujeme 3x.

6.3.3.2. Detekce produkce RNS a ROS pomocí fluorescenční sondy H₂DCF DA v protoplastech

- 1) Připravíme si vždy čerstvý roztok 0,2 mM H₂DCF DA naředěním 0,1 M HEPES, pH 7,5. Roztok uchovááme ve tmě.
- 2) Do jamky destičky pro měření fluorescence pipetujeme 100 μ l buněčné suspenze nebo 100 μ l LCM1 média (blank)
- 3) Přidáme 5 μ l čerstvě připravené 0,2 mM fluorescenční sondy H₂DCF DA.
- 4) Změříme fluorescenční signál (excitace 485 nm, emise 515 nm) okamžitě po přidavku H₂DCF DA a po 1 h inkubaci buněk s detekční sondou. Každé stanovení opakujeme 3x.

6.3.4. Vyhodnocení výsledků

V tabulce uvedeme přehledně naměřené hodnoty fluorescence pro jednotlivé vzorky změřené ve trojím opakování, vypočítáme jejich průměrnou hodnotu.

V případě sledování časového nebo koncentračního vlivu zvoleného stresového faktoru vypracujeme graf s příslušnou závislostí změn produkce NO na sledovaných parametrech.

6.3.5. Kontrolní otázky

Jaké znáte fluorescenční sondy používané pro detekci NO?

Jaký je detekční limit DAF-2 DA pro NO?

Která ze sond má vyšší fotostabilitu: DAF-2 DA nebo DAF-FM DA?

Pro detekci kterých látek se používá sonda H₂DCF DA?

POSTUP PRO ŘEZY

6.6.2. Materiál, chemikálie a přístroje

Chemikálie:

100 mM HEPES, pH 7,5

0,2 mM PTIO, 10 mM H₂DCF DA, 10 mM DAF-2 DA

4% agarosa, 50% glycerol.

Materiál: Žiletka, filtrační papír, štětce, Petriho misky, kultivační misky, miska s ledem, skalpel, krycí a podložní skla, pipety, teploměr, vteřinové lepidlo.

Rostlinný materiál: 7 denní semenáčky *Pisum sativum*

Přístroje: Světelný mikroskop, digitální kamera, mikrovlnná trouba, vibratom.

6.6.3. Pracovní postup

- 1) Do Petriho misky obsahující 4% agarosu zahřátou na 40 °C vložíme kolmo 0,5 cm segmenty stonku nebo kořene hrachu.
- 2) Po ochlazení v misce s ledem skalpelem vyřízneme kvádr agarosy 1,5 cm x 1,5 cm se vzorkem uprostřed, ten upravíme do tvaru pyramidy a základnu přilepíme na základní kostku vibratomu.
- 3) Podle pokynů vyučujícího připravíme řezy 50-100 μm, které pomocí štětečku přenášíme do označených Petriho misek obsahujících 100 mM HEPES, pH 7,5. Pro přípravu řezů použijeme kontrolní rostliny a rostliny odebrané 4h po mechanickém poškození.
- 4) Řez přeneseme na podložní sklíčko a přidáme 20 μl 10 μM roztoku DAF-2 DA resp. H₂DCF DA.
- 5) Po 5-10 min inkubaci barvicí roztok odpipetujeme a řezy opláchneme 100 mM HEPES, pH 7,5.
- 6) Pomocí fluorescenčního mikroskopu pozorujeme zelený fluorescenční signál (používaný hranol U-MWB2). Řezy barvené porovnáme s řezy nebarvenými (možná autofluorescence) a s řezy 10 min před vlastním barvením předinkubovanými v prostředí 0,1 mM PTIO.
- 7) Pomocí digitální kamery nainstalované na mikroskopu zhotovujeme snímky, které budou sloužit jako dokumentace výsledků.

Protokol histochemie NO

Pracovní roztoky:

všechny roztoky se připravují v zásobním pufru (obvykle 100mM HEPES, pH=7,5)
barvičky typu DAF jsou velmi citlivé na světlo a oxidaci = vždy připravit čerstvé a přechovávat ve tmě

10 μ M DAF-FM

naředěním 1000x zás. roztoku 10mM DAF-FM v DMSO (lednička 516)
obvykle pipetovat 999 μ l pufru + 1,0 μ l zásobního DAF-FM

0,1mM cPTIO

- naředěním 320x zás. roztoku 32mM cPTIO v DMSO (mražák -50oC)
- obvykle pipetovat 997 μ l pufru + 3,1 μ l zásobního cPTIO

1mM L-NAME

navážka 0,23 mg L-NAME / 1ml pufru

1mM aminoguanidin

navážka 0,11 mg aminoguanidinu / 1ml pufru

5mM wolframian sodný (dihydrát, MW= 329,86)

- navážka 1,6mg Na₂WO₄ /1ml pufru

0,1mM SNP (nitroprusside sodný dihydrát, MW=297,95)

- nejprve příprava 10mM SNP – navážka 2,97g / 1ml pufru
- zředit 100x pufrem na 0,1 mM

0,1mM rutin (MW = 664,57)

- nejprve příprava 10mM roztoku – navážka 6,64 mg /1 ml DMSO
- zředit 100x pufrem na 0,1mM

7. STANOVENÍ PEROXIDACE LIPIDŮ

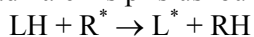
Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA, polyunsaturated fatty acids), a jejich metabolity mají nezastupitelnou roli v membránových strukturách, buněčné signalizaci, regulaci genové exprese (Poulos, 1995) a udělují fluiditu, flexibilitu a selektivní permeabilitu buněčným membránám. Všechny buněčné membrány jsou náchylné k oxidaci, a to vlivem vysokého obsahu PUFA, které jsou tvořeny působením desaturas na nasycené mastné kyseliny (Enoch et al., 1976). Mezi buněčnými makromolekulami vykazují PUFA největší citlivost k oxidativnímu poškození. Citlivost k oxidační přeměně se zvyšuje s počtem dvojných vazeb v molekule mastné kyseliny (Wagner et al., 1994).

U rostlin jsou PUFA obsaženy zejména v cytoplazmatické membráně, mitochondriích a plastidech. Jakékoli podmínky, kdy je narušena buněčná redoxní homeostáza, mohou být definovány jako oxidativní stres. Změny okolních podmínek jako proměnlivost teploty, vlhkost, dostupnost vody, zasolení nebo intenzita záření mohou způsobovat oxidativní poškození rostlin (Alscher et al., 1997). Membránové fosfolipidy jsou zvláště citlivé k oxidaci nejen vlivem vysokého obsahu PUFA, ale také kvůli jejich asociaci s neenzymovými a enzymovými systémy, schopnými tvořit prooxidativní formy volných radikálů v buněčné membráně (Catalá, 2006).

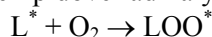
Proces lipidní peroxidace rozdělujeme na enzymovou a neenzymovou. S procesem enzymové lipidní peroxidace souvisí lipoxygenasy, jež zahrnují skupinu enzymů katalyzujících lipidní peroxidaci, která oxiduje volné a esterifikované PUFA na odpovídající hydroperoxidové deriváty (Kühn a Thiele, 1999). V případě neenzymové lipidní peroxidace se jedná o řetězovou reakci, řízenou volnými radikály, kdy jeden radikál může vyvolat oxidaci velkého počtu lipidních molekul, především fosfolipidů obsahujících PUFA (Porter, 1984).

4.1 Neenzymová lipidní peroxidace

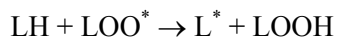
Reakce lipidní peroxidace je jako jiné radikálové reakce rozdělena na tři části, a to iniciace, propagace a terminace (Griotti, 1985). Probíhající řetězová reakce je iniciována oddělením atomu vodíku z atakované cis-methylenové skupiny residua PUFA (Dix a Aikens, 1993). Mononenasycené a nasycené mastné kyseliny jsou mnohem méně reaktivní a obvykle se neúčastní lipidní peroxidace. Mastné kyseliny s žádnou nebo s jednou dvojnou vazbou mohou podléhat oxidaci, ale ne řetězové lipidní peroxidace (například kys. olejová s 18 uhlíky a jednou dvojnou vazbou). I iniciace je obvykle provedena radikálem s příslušnou reaktivitou:



Molekulární kyslík velmi rychle atakuje lipidové radikály za tvorby lipidového peroxylového radikálu:



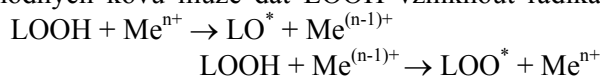
Tento vytvořený radikál má schopnost oddělit vodík z další polynenasycené mastné kyseliny (podobně jako je tomu při iniciaci):



Tato reakce se nazývá propagace a naznačuje, že jediná iniciace může způsobit přeměnu několika molekul polynenasycených mastných kyselin na lipidní hydroperoxydy. Lipidní hydroperoxydy (LOOH) jsou první, relativně stabilní produkty reakce lipidní peroxidace. Rozsah tohoto procesu limituje terminační reakce, kdy dochází k vytvoření neradikálového produktu:



Přítomnost iontů přechodných kovů může dát LOOH vzniknout radikálům schopným reiniciovat lipidní peroxidaci:



Pokud probíhá ve zvýšeném rozsahu, je neenzymová peroxidace lipidů velmi destruktivní proces. Jednak přímo poškozuje fosfolipidy membrán, navíc vznikající sekundární metabolity jsou velmi reaktivní a narušují strukturu dalších biomolekul. Toxické jsou především některé výše uvedené aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxy-2-nonenal), které se navazují na volné aminoskupiny proteinů. V důsledku toho se proteiny agregují, síťují a stávají se citlivější k proteolytické degradaci. Mění se fluidita membrán, zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází k lýzi buněk.

4.2. Enzymová lipidní peroxidace

Na enzymové lipidní peroxidaci se podílejí lipoxygenasy (LOX). Tyto enzymy katalyzují specifickou oxidaci PUFA atmosférickým kyslíkem (sekundárním substrátem). Jedná se o rodinu

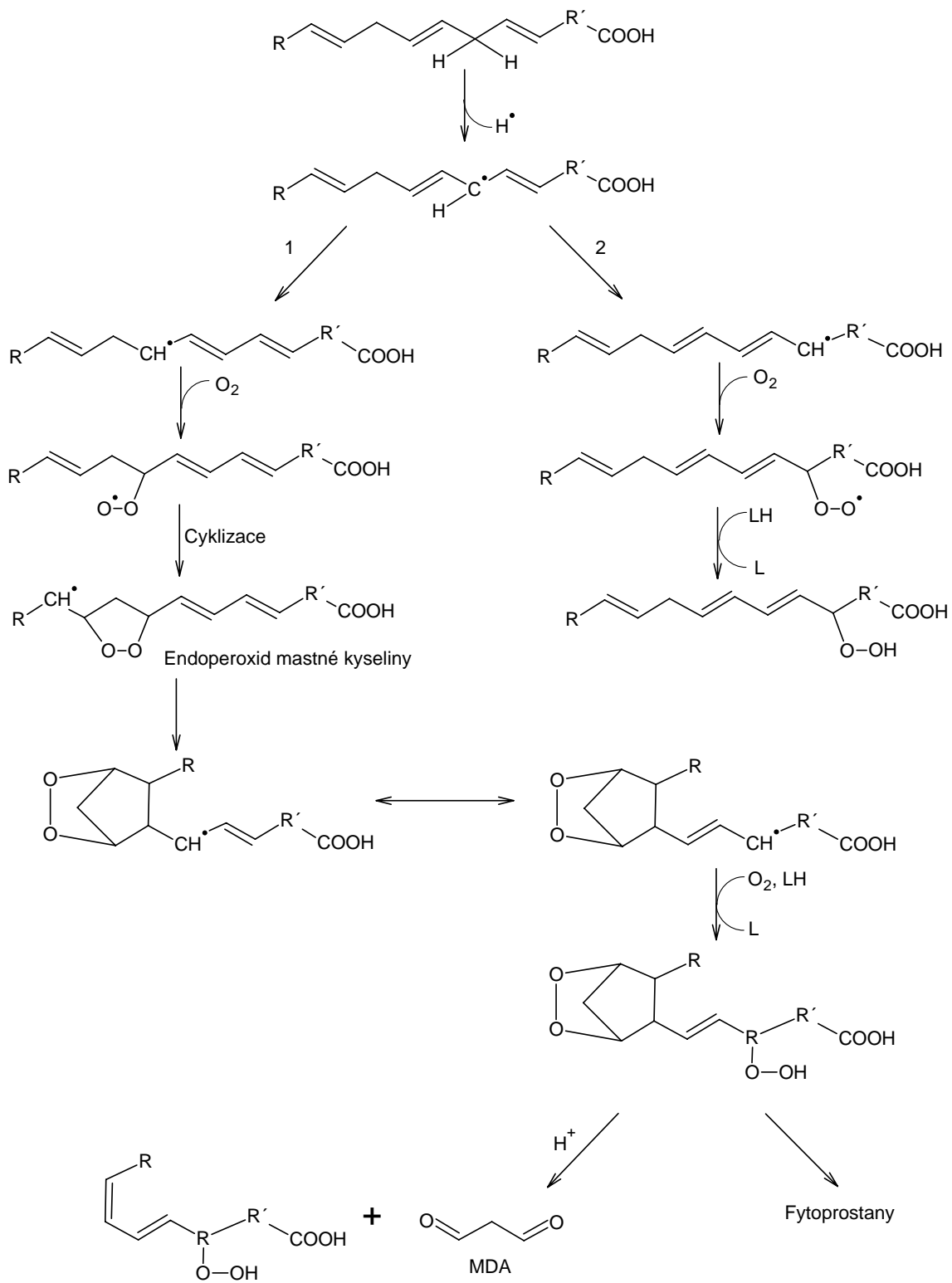
všudypřítomně exprimovaných enzymů. Na rozdíl od lipidních monooxygenas (např. cytochrom P-450), které většinou katalyzují hydroxylaci substrátu, LOX vnášejí na substrát molekulární kyslík za tvorby hydroperoxidů mastných kyselin (Kühn a Borchert, 2002). Většina LOX obsahuje v molekule enzymu nehemové železo, které je vázáno 4 histidiny a C-terminálním isoleucinem (Kuban et al., 1998).

LOX katalyzují oxidaci PUFA na jejich odpovídající peroxidové radikály. V principu se tyto reakce skládají ze tří základních kroků. Nejprve je vodík ve formě protonu odstraněn z methylenové skupiny PUFA za tvorby radikálu mastné kyseliny (přebývajícím elektronem je odstraněn aktivovaným železitým enzymem). Dále dochází k radikálovému uspořádání, které je spojeno s konjugací Z,E-dvojných vazeb. Následně molekulární kyslík stereospecificky vstupuje na C-1 nebo C-4 uhlík pentadienylového systému za tvorby hydroperoxidového radikálu mastné kyseliny. Tento reakční meziprodukt je redukován na odpovídající anion a enzym je oxidován zpět na železitou formu. Za normálních okolností nemohou reakce katalyzované LOX sloužit jako výkonný zdroj volných radikálů. Avšak za určitých experimentálních podmínek je možné docílit oslabení kontroly reakčního systému. Takto radikálový meziprodukt pak může uniknout z aktivního místa a může nespecificky reagovat s dalšími látkami (Kühn et al., 1990).

4.3. Reaktivní aldehydy generované během lipidní peroxidace

Přeměna primárních produktů lipidní peroxidace, lipidní peroxidů, vede v biologických systémech ke vniku široké škály aldehydů. Některé z těchto aldehydů jsou vysoce reaktivní a mohou rozšiřovat a zvyšovat aktivitu volných radikálů. Nejintenzivněji studovanými aldehydy jsou 4-hydroxy-2-nonenal, 4-hydroxy-2-hexenal a malonaldehyd. 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) je známý jako hlavní aldehyd tvořený během lipidní peroxidace ω -6 polynenasycených mastných kyselin, jako například kyselin linolové a arachidonové. HNE se akumuluje v membránách v koncentraci 10 μ M až 5 mM jako odpověď na oxidativní stres (Esterbauer et al., 1991). Na druhé straně, lipidní peroxidace ω -3 polynenasycených mastných kyselin jako α -linolenová a dokosahexanová vytváří blízké příbuzné sloučeniny, např. 4-hydroxy-2-hexenal (HHN), který je potenciálním zprostředkovatelem přechodu mitochondriální permeability (Kristal et al., 1996). 4-hydroxy-2-alkenaly reprezentují nejvýznamnější aldehydové látky, tvořené během lipidní peroxidace.

V porovnání s volnými radikály jsou aldehydy relativně stabilní a mohou difundovat nebo dokonce uniknout z buňky a atakovat cíle, které jsou daleko od původního místa vzniku. Tyto aldehydy vykazují velkou reaktivitu s biomolekulami, jako jsou proteiny, DNA a fosfolipidy, přičemž tvoří velké množství inter- a intramolekulárních kovalentních aduktů. Tyto aldehydy také mohou bioaktivovat molekuly za fyziologických či patologických podmínek. Mohou ovlivňovat a regulovat už při velmi nízkých koncentracích některé buněčné funkce např. převod signálů, exprese genů, růst buněk a všeobecně odezvu klíčových buněk (Uchida, 2003). Další důležité, reaktivní aldehydy pocházejí z lipidní peroxidace jsou ketoaldehydy, např. malondialdehyd (MDA) a glyoxal (Jain, 1984). Konkrétně MDA bývá označován jako nejvíce zastoupený koncový produkt lipidní peroxidace. Odhadem je více než 75% MDA odvozeno od trienových mastných kyselin, např. kyseliny α -linolenové (Davey et al., 2005). Malondialdehyd vzniká z PUFA obsahujících více než 2 dvojně vazby. Prvotním produktem oxidace polynenasycené mastné kyseliny je peroxylový radikál. Z tohoto může dále vznikat hydroperoxid mastné kyseliny (obr. 7, dráha 1), pokud se nachází radikálová část na jednom ze dvou konců systému dvojných vazeb. V případě, že je radikálová část uvnitř systému dvojných vazeb, konkuruje tvorbě hydroperoxidu cyklizace na sousední dvojnou vazbu (obr. 7, dráha 1). V takovém případě pak vzniká endoperoxid polynenasycené mastné kyseliny (meziprodukt vzniku MDA). Radikálový uhlík sousedící s cyklizací vytvořenou endoperoxidovou skupinou může reagovat s kyslíkem a vzniká peroxylový radikál mastné kyseliny. Ten může být redukován na hydroperoxid nebo může docházet k sekundární cyklizaci a vzniká pak nestabilní bicyklická sloučenina, ze které reakcí s O_2 a redukcí dochází k tvorbě bicyklického endoperoxidového hydroperoxidu mastné kyseliny. Při degradaci této komponenty vzniká MDA



Obr. 1: Schéma tvorby MDA z kyseliny α -linolenové (upraveno podle Marnett, 1999).

7.1. Metody založené na stanovení LPO prostřednictvím primárních koncových produktů

1) Metoda s xylénovou oranží

Organické peroxidy a hydroperoxy jsou primární produkty reakce mezi buněčnými složkami a volnými radikály. Hydroperoxy ve vzorku reagují s nadbytkem Fe^{2+} při nízkém pH v přítomnosti xylénové oranže a vzniklý obsah Fe^{3+} iontů se měří prostřednictvím vzniklého komplexu Fe-xylénová oranž (FOX) ve viditelné části spektra (Griffiths et al., 2000). Použitím této metody mohou být buď přímo nebo po drobných optimalizačních úpravách stanoveny např. H_2O_2 , butyl- a kumenhydroperoxy a hydroperoxy kyseliny linolové (Gay et al., 1999; Wolff, 1994).

2) Metoda s 3-perylendifenylfosfinem

Metoda s využitím 3-perylendifenylfosfinu (3-PeDPP) byla vyvinuta ke studiu lipidních hydroperoxidů v rafinovaných rybích olejích. 3-Perylendifenylfosfin reaguje s lipidními hydroperoxy za tvorby fluoreskujícího produktu 3-perylendifenylfosfin oxidu (3-PeDPPPO). Výsledky analýz lipidních hydroperoxidů zjištěných fluorescencí 3-PeDPPPO dobře korelují s klasickou metodou FOX (Chotimarkorn et al., 2005).

3) Analýza metodami hmotnostní spektrometrie

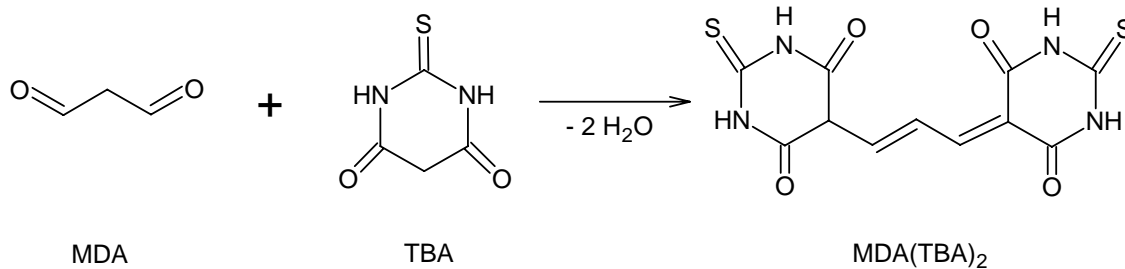
Plynná chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) je vysoce citlivá a specifická metoda pro stanovení těkavých alkanů. Ty mohou být ze vzorku separovány na chromatografické koloně a jednotlivé složky uvedených produktů lipidní peroxidace sledovány MS detektorem (Barylá et al., 2000). Metoda MALDI-TOF MS obdobně umožňuje možnost analýzy produktů peroxidace a fragmentace lipidů s vysokou senzitivitou, reprodukovatelností a přesností provedení. Metoda pracuje stejně dobře s čistými fosfolipidy jako s buněčnými extrakty v organických rozpouštědlech. Jako nejlepší matrice se ukázala 2,5-dinitrobenzoová kyselina (Schiller et al., 2006). Metoda MALDI je také perspektivní metodou pro sledování lipido-proteinových konjugátů, které vznikají jako adukty mezi reaktivními produkty lipidní peroxidace, zejména 4-hydroxy-2-nonenalu, a nukleofilních částí proteinové molekuly, zejména s histidinovými a cysteinovými zbytky. S výhodou je možné pro detekci aduktů využít jejich difenylhydrazony při současném použití 2,4-dinitrofenylhydrazinu jako MALDI matrice (Fenaille et al., 2004).

7.2. Metody založené na stanovení LPO prostřednictvím sekundárních koncových produktů

A) Metoda TBARS

Tento test využívá kyseliny thiobarbiturové (TBA) pro měření obsahu malondialdehydu (MDA), který je tvořen během autooxidace nebo enzymové degradace polynenasycených mastných kyselin v buňkách, jako sekundární koncový produkt. Je tedy označován jako užitečný index pro hodnocení lipidní peroxidace (Heath a Packer, 1968).

Stanovení MDA spočívá v reakci malondialdehydu se dvěma molekulami thiobarbiturové kyseliny prostřednictvím nukleofilní adice v kyselém prostředí, kdy vzniká růžovo-červené zbarvení s maximem absorpance při 532 nm. Tento postup stále zůstává oblíbený, díky své jednoduchosti a rychlosti.



Reakce mezi MDA a kyselinou thiobarbiturovou vedoucí k tvorbě sloučeniny s maximem absorpance při 532 nm (upraveno podle Du a Bramlage, 1992).

Nevýhodou použití této metody u rostlinných extraktů je možnost nadhodnocení obsahu MDA vlivem interferujících látek jako jsou anthokyany a sacharidy (Taulavuori et al., 2001). Korigovaná metoda TBARS využívá odečtení absorbance při 532 nm roztoku obsahujícího rostlinný extrakt inkubovaný bez přídavku TBA od identického vzorku, k němuž byla TBA přidána (Hodges et al., 1999).

B) Metoda s využitím 1,3-diethyl-2-thiobarbiturové kyseliny

Metoda s využitím kyseliny TBA je velmi rozšířená pro své jednoduché provedení. Avšak jak již bylo zmíněno, negativní roli zde hrají interferující sloučeniny, které mohou obsah MDA nadhodnocovat. V této metodě byla TBA nahrazena kyselinou 1,3-diethyl-2-thiobarbiturovou (DETBA). Chromogen MDA-DETBA je méně polární než MDA-TBA a je možno jej lépe oddělit extrakcí na pevné fázi a pak kvantifikovat jako u TBARS metody (Guichardant et al., 1994).

C) Metoda s využitím HPLC analýzy

Tato technika se využívá k ověření koncentrace aduktů MDA-TBA v rostlinném extraktu, protože rostlinná pletiva obsahují mnoho sloučenin, které mohou v reakci TBARS interferovat. Je tedy využíván stejný reakční princip jako u výše uvedené TBARS metody. Využití HPLC je sice časově náročnější než čistě spektrofotometrické stanovení TBARS, ale dochází k mnohem přesnějšímu stanovení produktů lipidní peroxidace vlivem jejich účinné separace na chromatografické koloně. Je tedy možné eliminovat nadhodnocení obsahu MDA způsobované interferujícími sloučeninami. Dále můžeme techniku využít v systémech HPLC s UV detekcí nebo LC-MS k určení derivátů reaktivních karbonylových sloučenin, a to derivátů 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH), pentafluorfenylhydrazinu (PFPH), cysteinaminových nebo N-methylhydrazinových (Shibamoto, 2006).

D) Metoda s N-methyl-2-fenylindolem

Tato metoda je založena na reakci chromogenního činidla N-methyl-2-fenylindolu (NMPI) s MDA a 4-hydroxyalkenaly při 45°C. Jedna molekula MDA nebo 4-hydroxyalkenalu reaguje se dvěma molekulami NMPI a poskytuje stabilní zbarvení s maximem absorbance při 586 nm. Pro současné stanovení MDA i 4-hydroxyalkenalů se používá postup využívající přídavek methanosulfonové kyseliny (MSA). Naopak varianta metody používající HCl detekuje pouze MDA, protože 4-hydroxyalkenaly za těchto podmínek netvoří zbarvení s NMPI (Gerard-Monnier, 1998).

POSTUP

1. Spektrofotometrické stanovení TBARS – nekorigovaná metoda (podle Hodges 1999)

Zásobní roztoky:

Extrakční činidlo:	etanol / 20% kys. trichloroctová v poměru 4:1
TBARS - činidlo A:	20% kys. trichloroctová, 0,01% butyl-hydroxytoluen
TBARS - činidlo B	20% kys. trichloroctová, 0,01% butyl-hydroxytoluen + 0,65% TBA

Standard MDA = 1,1,3,3- tetraethoxypropan (MW 220,31, hustota 0,919)

- připravit 10ml 1mM MDA (navážka 2,2 mg – odpovídá 2,3 μ l)
- pro kalibraci naředit 1mM MDA na koncentrační řadu 0,1- 0,5 – 1 – 2,5 - 5 – 7,5 - 10 μ M MDA v objemu 5ml (odpovídá 0,1-10nmol/ml vzorku)

Příprava rostlinných extraktů

- 1) Odvažte cca 2g rostlinného materiálu
- 2) K rostlinnému vzorku přidejte ve třecí misce 2-násobný objem extrakčního činidla a rozetřete na homogenní extrakt
- 3) Extrakt napipetujte do 2ml plastových zkumavek a centrifugujte 15 min při 13000g. Supernatant použijte pro reakci s TBARS.

Provedení metody TBARS :

Pro každý vzorek se provádí reakce ve dvojnásobném opakování s oběma činidly A i B:

1. Do 2ml plastové zkumavky pipetujte 1ml vzorku nebo standardu (jako blank použijte 1ml extrakčního činidla)
2. Do zkumavek přidejte 1ml činidla A nebo činidla B
3. Zahřívejte 25min na termobloku při 95°C
4. Ochlaďte na ledové lázni
5. Centrifugujte 5min při 15000 x g
6. Přepipetujte 200ul supernatantu do mikrotitrační destičky
7. Změřte absorbanční supernatantu při 440, 532 a 600nm

Vyhodnocení výsledků:

- 1) $[(Abs_{532+TBA}) - (Abs_{600+TBA}) - (Abs_{532-TBA} - Abs_{600-TBA})] = A$
- 2) $[(Abs_{440+TBA} - Abs_{600+TBA}) \cdot 0.0571] = B$
- 3) MDA equivalent (nmol /ml) = $(A-B)/157\,000 \times 10^6$

8. STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY V ROSTLINNÝCH EXTRAKTECH

Teoretický úvod

Na rostliny v průběhu jejich vývoje a růstu působí řada stresových faktorů, které mohou vyvolat zvýšenou tvorbu reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS). Jedná se o nestálé a vysoce reaktivní molekuly, vznikající částečnou redukcí atmosférického kyslíku. Stav, kdy dochází ke nadměrné produkci ROS, vede k tzv. oxidačnímu stresu. Organismy mají schopnost se proti oxidačnímu stresu bránit a to pomocí antioxidačních systémů. Ty chrání rostlinu proti negativnímu a škodlivému působení volných radikálů. Antioxidační systémy mohou být povahy enzymové nebo neenzymové.

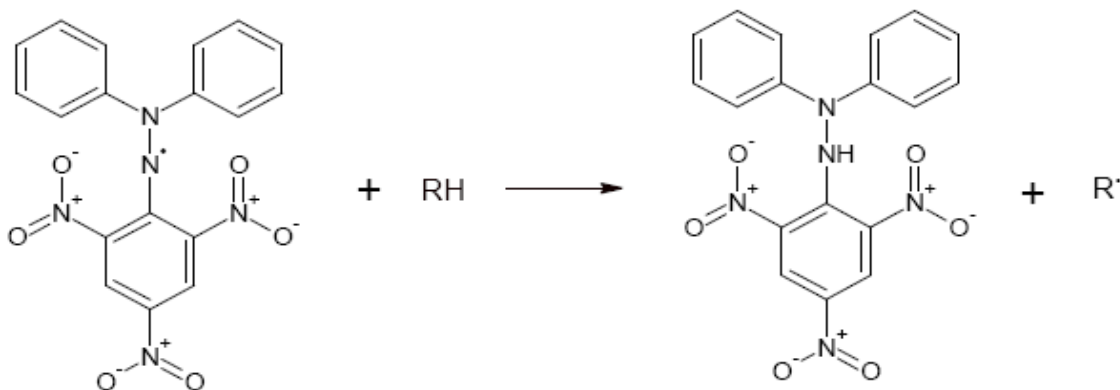
Ke stanovení celkové antioxidační kapacity se používá řada spektroskopických a luminiscenčních metod založených na měření kapacity vzorku inhibovat produkci radikálů:

A) Spektrofotometrické metody se používají pro stanovení vlastností látek reagovat jako zhašeče volných radikálů měřením změny absorbance při daných vlnových délkách charakteristických pro jednotlivé radikály. Mezi nejčastěji používané patří metody sledující zhašení radikálů DPPH a ABTS.

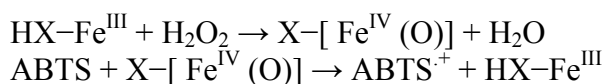
B) Chemiluminiscenční metoda je založená na měření kapacity vzorku zhašet radikály produkované oxidací luminolu (3-aminoftalhydrazid). K oxidaci dochází působením peroxidu vodíku za katalýzy křenuvou peroxidasou. Reakce vede k emisi modrého světla. Světelná emise je inhibována po přidavku antioxidačního činidla. Chemiluminiscenční reakce mají vysokou citlivost a selektivitu, jsou jednoduché a poměrně levné.

Antioxidační kapacita se nejčastěji udává v μmol použitého standardu, jakým je např. látka Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), kys. askorbová a další antioxidy.

Spektrofotometrická metoda s DPPH: Stabilní radikál DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl nebo také 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) má purpurovou barvu a je široce užíván pro stanovení antioxidační aktivity látek. Mechanismus reakce spočívá ve spárování nepárového elektronu radikálu DPPH s atomem vodíku antioxidantu za vzniku redukovaného DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazinu, Obr. 1). Pokles absorbance je měřen spektrofotometricky při absorpčním maximu 515 nm a je dán změnou purpurového zbarvení ve žluté. Celková antioxidační aktivita se vyjadřuje v ekvivalentech molárního množství μmol Troloxu nebo kyseliny askorbové popř. jiného použitého standardu na 1 gram vzorku.

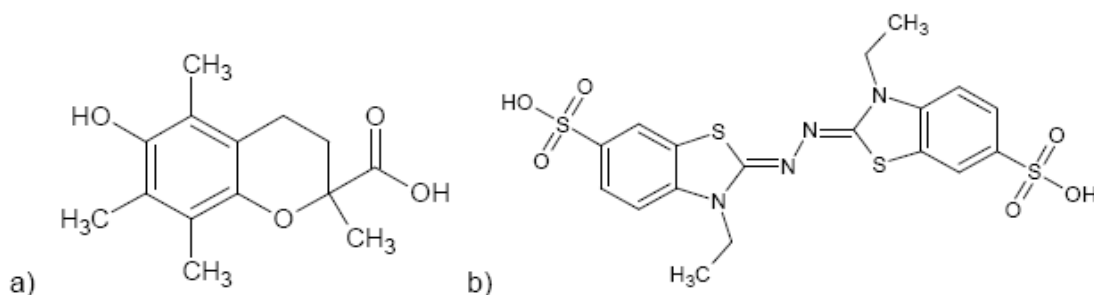


Obr. 1: Reakce radikálu DPPH s antioxidantem za vzniku 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazinu.
Spektrofotometrická metoda s ABTS: Metoda testuje schopnost látek zhášet kationradikál $ABTS^+$ (2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina, Obr. 2) ve vodném prostředí, častěji v prostředí pufru (K-fosfátový pufr, pH 7,5). Kationradikál $ABTS^+$ má modrozelenou barvu a je nejčastěji generován oxidací systémem $ABTS/H_2O_2$ /peroxidasa nebo systémem $ABTS$ /metmyoglobin/ H_2O_2 , jehož průběh můžeme znázornit schématem:



($HX-Fe^{III}$ - myoglobin; $X-[Fe^{IV}(O)]$ - ferryomyoglobin).

Další cestou oxidace ABTS může být použití peroxidisíranu draselného nebo oxidu manganického. Antioxidační činidlo se přidává k již připravenému radikálu nebo k čerstvě vyvíjejícímu se radikálu $ABTS^+$ přímo v reakční směsi. Pokles absorbance je měřen spektrofotometricky při vlnových délkách 645, 734 a 815 nm a je patrný ztrátou charakteristické modrozelené barvy. Výsledná antioxidační kapacita je srovnávána s antioxidační kapacitou syntetické látky Troloxu a je vyjádřena v mmol Troloxu na 1 gram vzorku. Proto se pro metodu často užívá název TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Metoda je rychlá, jednoduchá a instrumentálně nenáročná.



Obr. 2: Strukturální vzorce reagensů: a) TROLOX, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, b) ABTS, 2-azinobis-(3-ethyl-benzthiazolin-6-sulfonát).

Chemikálie a materiál

Methanol, p.a.

0,1 M fosfátový pufr, pH 7 (navážka 5,44 g KH_2PO_4 a 10,4 g K_2HPO_4 /1 L, upravit pH na 7,0 pomocí NaOH nebo kyselinou fosforečnou)

Roztoky pro spektrofotometrickou metodu s DPPH:

67 μ M DPPH (MW = 395,326; 1,32 mg/50 ml methanolu)

1 mM kys. askorbová (MW = 176,12; navážka 1,8 mg/10 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7)

Roztoky pro spektrofotometrickou metodu s ABTS:

372 mM persíran amonný - $(NH_4)_2S_2O_8$ (MW = 228; navážka 4,24 mg na 50 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7)

1,6 mM ABTS (MW = 548,68; navážka 8,78 mg/10 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7)

1 mM Trolox (MW = 250,29; navážka 2,503 mg/10 ml methanolu)

mořský písek, třecí miska s tloučkem, centrifuga, pipety a špičky, váhy, mikrodestička, mikrodestičkový reader, eppendorfky, 50 ml kádinky, laboratorní lžička, špachtle, plastová zkumavka

rostlinný materiál (etioloovaný a zelený hrášek)

POSTUP

I. Příprava extraktů klíčků (nadzemní části) etiolovaného a zeleného hrášku

- a) Odvažte 1,5 g rostlinného materiálu a homogenizujte jej v třecí misce s mořským pískem v poměru 1:1 (w/v) a s vychlazeným 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7 v případě metody s DPPH, nebo s vychlazeným methanolem v případě metody s ABTS. **Homogenizaci a veškeré ostatní operace je nutné provádět za chlazení v ledové lázni!!!**
- b) Homogenát přelijte do eppendorfky a centrifugujte 15 minut při 15000 x g a teplotě 4°C.
- c) Supernatant odpipetujte do čisté eppendorfky a použijte pro následující měření celkové antioxidační kapacity. Vzorek ponechejte v ledové lázni.

II. AOX kapacita - metoda s ABTS s čerstvě připraveným radikálem ABTS⁺

- a) Připravte si ze zásobního 1mM roztoku TROLOXu roztoky Troloxu o koncentraci 10; 20; 40; 60; 80 a 100 μM (vždy po 1 ml) ředěné methanolem
- b) Do jamky na mikrodestičce napipetujte v trojím opakování 50 μl methanolu (blank) nebo 50 μl roztoku Troloxu (standarty o různé koncentraci) nebo 50 μl extraktu
- c) Do každé jamky přidejte 50 μl 372 mM persíranu amonného .
 - a) Reakci startujte přidávkem 100 μl 1,6 mM radikálu ABTS
 - b) Inkubujte 50 min při laboratorní teplotě a změřte úbytek absorbance při 734 nm.

III. Stanovení antioxidační kapacity spektrofotometrickou metodou s DPPH

- a) Připravte si ze zásobního 1mM roztoku kys. askorbové roztoky kys. askorbové o koncentraci 10; 20; 40; 60; 80 a 100 μM (vždy po 1 ml) ředěné fosfátovým pufrům
- b) Do jamky na mikrodestičce napipetujte v trojím opakování 50 μl fosfátového pufru (blank) nebo 50 μl standardu nebo 50 μl extraktu
- c) Reakci startujte přidávkem 150 μl 67 μM radikálu DPPH
- d) Inkubujte 10 min při laboratorní teplotě a změřte úbytek absorbance při 515nm.

Vyhodnocení

Celkovou antioxidační kapacitu vyjádřete v **μmol standardu (kyseliny askorbové/troloxu)/1g čerstvé váhy (FW) vzorku**. Výsledky obou experimentů porovnejte.

Kontrolní otázky

Literatura

9. STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMŮ PODÍLEJÍCÍCH SE NA DEGRADACI AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU

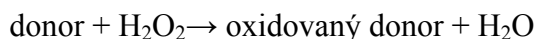
Teoretický úvod

Rostliny jsou v průběhu svého života vystavovány působení řady stresových faktorů, které mohou způsobit poškození jejich životních funkcí nebo jednotlivých orgánů a vést až k uhynutí rostliny. Působení stresových faktorů může u rostliny vyvolat oxidativní stres, charakteristický prudkou přechodnou tvorbou velkého množství reaktivních forem kyslíku (Reactive oxygen species, ROS). Dochází k porušení rovnováhy mezi jejich produkcí a odbouráváním. Zdrojem ROS je řada redoxních reakcí, jako např. redukce kyslíku v průběhu elektronového transportu v mitochondriích nebo fotolýza vody chloroplastovým elektronovým transportním řetězcem. Produkce singletového kyslíku následně stimuluje vznik dalších aktivních forem kyslíku (Tab. 1), např. peroxidu vodíku, superoxidového nebo hydroxylového radikálu. Tyto reaktivní molekuly působí destruktivně na lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. ROS nejsou jen toxickými vedlejšími produkty metabolismu, ale fungují také jako signální molekuly kontrolující obranné procesy rostlinného organismu a hrají významnou roli v procesu programované buněčné smrti. Ochranu před oxidačním poškozením organismu aktivními formami kyslíku zajišťuje řada antioxidantních obranných systémů lokalizovaných v různých buněčných strukturách, jedná se o neenzymové a enzymové systémy. Antioxidanční kapacita je velmi závislá na působení stresových faktorů, stejně jako na druhu, stadiu vývoje a na fyziologickém věku rostliny. Z neenzymových systémů řadíme mezi velmi účinné antioxidanty askorbát, β -karoten, redukovaný glutation či α -tokoferol.

Nejuniverzálnější ochranu proti poškození aktivními formami kyslíku ve všech částech buněk poskytují některé speciální enzymy a enzymové systémy. Zabraňují iniciaci řetězových oxidací odstraňováním částečně redukováných kyslíkových forem jako superoxid a peroxid vodíku. Aby rostliny mohly kontrolovat množství reaktivních forem kyslíku a chránit buňky před oxidativním stresem, obsahují rostlinná pletiva řadu mechanismů, které se podílejí na degradaci ROS. Jedná se o enzymy (např. superoxidodismutasa, katalasa, peroxidasa a glutathionperoxidasa) a systém nízkomolekulárních antioxidantů (např. kyselina askorbová, glutathion, fenolické sloučeniny, tokoferol) (Blokhina et al., 2003). Jednotlivé enzymové a neenzymové antioxidanty se specificky vyskytují v různých subcelulárních strukturách. Antioxidanční kapacita je velmi závislá na typu a intenzitě působení stresového faktoru, stejně jako na druhu, stadiu vývoje a na fyziologickém věku rostliny (Dat et al., 2000).

Jeden z antioxidantních enzymů je **katalasa**, která se nachází ve všech aerobních eukaryotech a účastní se odstraňování peroxidu vodíku (katalyzuje reakci $2 \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$) produkovaného v peroxisomech oxidasami β -oxidace mastných kyselin, glyoxylátového cyklu nebo při katabolismu purinů. Může katalyzovat přímý rozpad peroxidu vodíku (katalasová aktivita) nebo oxidaci substrátů jako methanol, ethanol, formaldehyd, formát a nitrit peroxidem vodíku (peroxidasová aktivita). Existují tři hlavní isoformy tohoto enzymu: CAT1, CAT2 a CAT3. Katalasa je enzym obsahující skupinu Hem.

Dalším z antioxidantních enzymů, který se podílí na degradaci peroxidu vodíku, je peroxidasa. Rostlinné peroxidasy (POX, donor: H_2O_2 oxidoreduktasy, EC 1.11.1.7) jsou enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny (Siegel, 1993):



Identifikovat specifické funkce individuálních peroxidas je díky jejich nízké substrátové specifitě *in vitro* a díky přítomnosti mnoha isoenzymů obtížné (Hiraga et al., 2001). Existuje však funkce společná pro všechny peroxidasy, a tou je schopnost detoxikovat peroxid vodíku. Peroxidasy se také účastní vývojových procesů, pravděpodobně skrze jejich zahrnutí v metabolismu auxinu a zesíťování vazeb mezi složkami buněčné stěny (Cella & Carbonera, 1997).

Peroxidasy jsou většinou monomerní hemoglykoproteiny, jejichž prostetickou skupinu tvoří obvykle ferriprotoporfyrin IX. Existují však i peroxidasy s pozměněným porfyrinovým skeletem nebo v nich porfyrin dokonce chybí. Tyto peroxidasy pak obsahují ionty některých prvků, např. manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+}). Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin: hemové peroxidasy, vanadové peroxidasy a ostatní peroxidasy. Nejpočetnější je skupina peroxidas, jejichž katalytické centrum obsahuje hem. Relativní molekulová hmotnost funkční peroxidasy se pohybuje v rozmezí 42-158 kD.

V rostlinných buňkách jsou peroxidasy bohatě zastoupeny. Mohou být buď volné (přítomné v cytoplasmě, vakuolách, mezibuněčném prostoru) nebo vázané (v buněčné stěně, plazmatické membráně nebo organelových membránách). Vazba může být iontová, ale i kovalentní. Distribuce souvisí s bazicitou peroxidas. Ve volné formě jsou především aniontové formy POX, zatímco kationtové jsou spíše vázané v membránových a buněčných strukturách. Peroxidasová aktivita se v rostlinách zvyšuje v průběhu stárnutí a jako reakce na stres. Další funkcí peroxidas v rostlinách je zapojení do regulace růstu. Peroxidasy regulují hladinu růstového hormonu auxinu a jsou rovněž klíčovými molekulami v procesech rychlé adaptace rostlin při změně vnějšího prostředí. Peroxidasy lokalizované v buněčné stěně se podílejí na vychytávání radikálů, které poškozují membrány. Hrají také významnou roli při všech oxidačně-kondenzačních procesech tj. především při procesech lignifikace. POX se podílejí na zesíťování stavebních jednotek ligninu. Jiné peroxidasy (ligninperoxidasa, manganperoxidasa) mají schopnost lignin depolymerovat (Chromá et al., 2001).

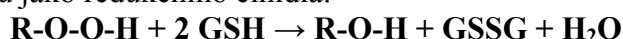
POX se nachází prakticky ve všech rostlinných pletivech (kořeny, stonky, listy, jehlice a další) (Chromá et al., 2001), z nichž se extrahuje převážně pomocí fosfátových a Tris-HCl pufrů. Dalšími pufrů, které se používají pro extrakci peroxidasy jsou např. Tris-glycinový, Bis-Tris, acetátový, imidazol-HCl a citrátový pufr. Volná (rozpustná) peroxidasa se získá extrakcí rostlinného materiálu s využitím extrakčních pufrů o nízké koncentraci a vhodném pH. Pro uvolnění iontově vázané peroxidasy je nutné použít extrakční pufr s vysokým obsahem KCl (NaCl). Membránově vázanou peroxidasu lze extrahovat pufrům obsahujícím Triton X-100. Kovalentně vázané peroxidasy v buněčné stěně se uvolní extrakčním pufrům s obsahem celulasy a pektinasy (Sánchez-Romero et al., 1993).

Aktivita peroxidasy se detekuje převážně spektrofotometricky za použití chromogenních substrátů. Existuje více než 200 metod na stanovení aktivity tohoto enzymu. Nejpoužívanějšími substráty jsou guajakol a pyrogallol (Gramss & Rudeschko, 1998). Dalšími substráty, které lze použít pro stanovení aktivity peroxidasy jsou například Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin), aminoantipyrin, syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxy-benzaldehydazin), nebo dianisidin.

Nejčastěji používaným substrátem pro stanovení aktivity peroxidasy je guajakol. Reakce je realizována zejména v prostředí fosfátového pufru, případně acetátového a Tris/HCl pufru. Peroxid vodíku je za přítomnosti guajakolu (2-methoxyfenolu) a peroxidasy rozkládán na kyslík a vodu. Kyslík oxiduje bezbarvý guajakol na žlutohnědý 3,3'-dimethoxy-4,4'-bifenoquinon (Doerge et al., 1997), což se projeví změnou absorbance. Aktivita POX se stanoví na základě změny absorbance za minutu. Používaná vlnová délka se pohybuje v rozmezí 420-485 nm (např. 420 nm - Prasad et al., 1999; 436 nm - Criquet et al., 2001; 470 nm - Teisseire & Guy, 2000 nebo 485 nm - Sánchez et al., 2000).

Vlastní uspořádání guajakolové metody stanovení POX se výrazně liší v publikovaných pracích, zaměřených na studium POX a jeho zapojení v obranném mechanismu rostlin. Rozdíly jsou jak v použití typu, koncentrace a pH pufru, tak i v koncentraci peroxidu vodíku a guajakolu v reakční směsi.

Mezi významné enzymové systémy uplatňující se zejména při zamezení peroxidace membránových lipidů patří rozsáhlá skupina **glutathionperoxidas**, které katalyzují redukci peroxidu vodíku, organických peroxidů a peroxidů lipidů příslušné alkoholy a vodu za přítomnosti glutathionu jako redukčního činidla:



Oxidovaný glutathion GSSG je recyklován na redukovanou formu (GSH) enzymem glutathion reduktasou (GR) za současné oxidace NADPH:



Oxidace NADPH na NADP^+ je spojena se snížením absorbance při 340nm.

Dále se na odstraňování ROS podílí enzymy askorbát-glutathionového cyklu. Tento cyklus, také nazývaný Foyerův-Halliwellův-Asadův, odstraňuje peroxid vodíku z buněčných oddělení, ve kterých tento metabolit vzniká a ve kterých není přítomna katalasa. Tento cyklus využívá neenzymové antioxidanty askorbát a glutathion v sérii reakcí katalyzovaných antioxidantními enzymy a probíhá v chloroplastech, peroxisomech, cytosolu a mitochondriích. První enzym cyklu, **askorbátperoxidasa**, katalyzuje reakci peroxidu vodíku a askorbátu za vzniku monodehydroaskorbátu, případně dehydroaskorbátu ($\text{AA} + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{DHA} + 2 \text{H}_2\text{O}$). Není-li monodehydroaskorbát znovu redukován na askorbát monodehydroaskorbátreduktasou, samovolně disproportionuje na askorbát a dehydroaskorbát. Ten je zpětně přeměňován na askorbát reakcí katalyzovanou dehydroaskorbátreduktasou v přítomnosti redukovaného glutathionu (GSH) za vzniku jeho oxidované formy (GSSG). Redukovaný glutathion je obnoven glutathionreduktasou v reakci závislé na NADPH.

Z dalších enzymů podílejících se na odstraňování ROS je to např. superoxiddismutasa nebo fosfolipidhydroperoxidglutathionperoxidasa.

Tab. 1.: Značení a molekulární struktury aktivních forem kyslíku v rostlinách.

Sloučenina	Zkrácené značení
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$
Superoxidový anionradikál	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Hydroxylový radikál	OH^{\cdot}
Perhydroxylový radikál	$\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$
Peroxid vodíku	H_2O_2

Chemikálie a materiál

Zásobní pufr pro extrakce a měření aktivity:

0,1 M fosfátový pufr, pH 7,5 (5,44 g KH_2PO_4 a 10,4 g K_2HPO_4 /1 L, upravit pH na 7,5 pomocí NaOH nebo kyseliny fosforečné)

2 mM EDTA- Na^+ (MW = 372,32; 0,74 g/ 1 l)

mořský písek, rostlinný materiál (zelený hrášek a etiolovaný hrášek),

třecí miska s tloučkem, pipety a špičky, centrifuga, eppendorfky, váhy, mikrodestička pro měření v UV oblasti, mikrodestičkový reader, laboratorní lžička, špachtle, 50 ml kádinka, 10 ml odměrný válec, plastová zkumavka, váženky

POSTUP

I. Příprava rostlinného extraktu

Připravte si extrakční pufr - na každých 10 ml zásobního pufru přidejte:

1% PVPP (polyvinylpolypyrrolidon), navážka 100 mg

2 mM DTT (dithiothreitol, MW = 154,253); navážka 3,1 mg

0,5 mM pefabloc (inhibitor proteas, MW = 230,69; 0,055 g/0,5 l)

Při extrakci enzymů je nutné veškerou manipulaci s rostlinným materiálem provádět za chlazení v ledové lázni!!!

- Odvažte cca 2 g rostlinného materiálu a ve třecí misce, která je uložena v ledové lázni, rozetřete s vychlazeným extrakčním pufrům v poměru 1:4 (w/v) spolu s mořským pískem.
- Homogenát přelijte do 2ml eppendorfky a centrifugujte 10 minut při 15 000 xg a teplotě 4°C.
- Supernatant odpipetujte do čisté eppendorfky a použijte k měření. Vzorek skladujte na ledové lázni.

II. Stanovení aktivity askorbátperoxidasy (APX) a guajakolperoxidasy

Pro měření je nutné připravit čerstvé roztoky:

- 0,7 mM peroxid vodíku (MW = 34,0; 30%, cca 8,8 M) – naředit nejprve na 100 mM (11 μ l + 989 μ l vody), z něho poté připravit 0,7 mM (7 μ l + 993 μ l vody),
- 1,75 mM roztok askorbátu (MW = 176,12; navážka 3,06 mg/10 ml dH₂O)

Postup –aktivita askorbátperoxidasy:

Do jamky na mikrodestičce, která je určena pro měření v UV oblasti, napipetujte:

- 125 μ l 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- 72 μ l 1,75 mM roztoku askorbátu
- 15 μ l extraktu (pravděpodobně jej budete muset ředit, zejm. u zeleného hrášku), u blanku použijte místo extraktu extrakční pufr
- Reakci startujte přidáním 38 μ l 0,7 mM čerstvě připraveného roztoku peroxidu vodíku (ve výsledné koncentraci je 0,1 mM)
- Sledujte pokles absorpance při 290 nm v intervalech 10 s po dobu 1 minuty.

Postup – aktivita guajakolperoxidasy:

Do jamky na mikrodestičce napipetujte:

- 125 μ l 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- 72 μ l 35 mM guajakolu
- 15 μ l extraktu (pravděpodobně jej budete muset ředit, zejm. u zeleného hrášku), u blanku použijte místo extraktu extrakční pufr
- Reakci startujte přidáním 38 μ l 0,7 mM čerstvě připraveného roztoku peroxidu vodíku (ve výsledné koncentraci je 0,1 mM)
- Sledujte nárůst absorpance při 436 nm v intervalech 8 s po dobu 1 minuty.

Měření proveďte ve 3 opakování (3 jamky).

III. Stanovení aktivity katalasy (CAT)

Před měřením je nutné připravit 10 ml 60 mM roztoku peroxidu vodíku H_2O_2 (68 μl 30 % H_2O_2 /10 ml H_2O).

Do jamky na destičce, která je určena pro měření v UV oblasti, napipetujte:

Blank:

- a) 290 μl 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- b) 10 μl extraktu

Vzorek:

- a) 240 μl 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- b) 10 μl extraktu
- c) 50 μl 60 mM peroxidu vodíku
- d) Změřte změnu absorbance při 240 nm po 30 s po dobu 5 minut.

Měření proveďte ve 3 opakování (3 jamky).

Souběžně proveďte měření i s komerčně dostupnou katalasou Catalase from bovine 2114 U/mg:

Z komerčně dostupného preparátu připravte roztok: odvažte 2 mg enzymu a rozpusťte v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru, pH 7.

Do jamky na destičce, která je určena pro měření v UV oblasti, napipetujte:

Blank:

- a) 250 μl 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- b) 50 μl 60 mM peroxidu vodíku

Vzorek:

- a) 245 μl 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,0
- b) 50 μl 60 mM peroxidu vodíku
- c) 5 μl připraveného roztoku katalasy, který jste předem zředili 100x
- d) Změřte změnu absorbance při 240 nm po 30 s po dobu 5 minut.

Měření proveďte ve 3 opakování (3 jamky).

IV. Stanovení aktivity glutathiooxidasy (GPX)

Pro měření je nutné připravit čerstvé roztoky, které uchovávejte na ledové lázni:

- c) 60 mM GSH (MW = 307,43; 18,5 mg/ml reakčního pufru),
- d) 2 mM NADPH v 0,1% Na_2CO_3 (MW = 744,41; 1,5 mg/ml 0,1% Na_2CO_3),
- e) 1 mM peroxid vodíku (MW = 34,0; 30%, cca 8,8M) – naředit nejprve na 100 mM (11 μl + 989 μl vody), z něho poté připravit 1 mM (10 μl + 990 μl vody) – použijte již ten připravený z měření aktivity APX
- f) 1 mM t-butylhydroxyperoxid (MW = 90,1 (70 %, cca 7,8 M) – naředit nejprve 100 mM (13 μl + 987 μl vody), z něho poté 1 mM (10 μl + 990 μl vody),
- g) glutathionreduktasa (Sigma, 2,7 mg/ml, 168 U/mg = 453,6 U/ml, 1U v 2,2 μl)

Dále připravte 20 ml reakčního pufru ze zásobního reakčního pufru přidáním 40 mM aminotriazolu - inhibitor katalas, (MW = 84; 3,4 mg/ml).

Do jamky na destičce, která je určena pro měření v UV oblasti, napipetujte:

- a) 138 μl reakčního pufru
- b) 10 μl GSH

- c) 10 μ l NADPH
- d) 2 μ l glutathionreduktasy
- e) 20 μ l vzorku (u blanku se místo vzorku použije reakční pufr)
- f) Směs lehce promíchejte a inkubujte min. 3 min při 37°C.
- g) **Reakci startujte přidavkem 20 μ l 1 mM peroxidu.** Použijte ve 3 jamkách peroxid vodíku, v dalších 3 pak t-butyhydroxyperoxid.
- h) Měřte změnu absorbance při 340 nm při 37 °C (měření provádějte až nakonec neboť mikrodestičkový reader pak delší dobu chladne zpět na 30 °C) po 10 s během 1 minuty.

Vyhodnocení

Vypočítáme aktivitu peroxidasy ze vztahu $A = c \cdot \epsilon \cdot l$ (A = absorbance, ϵ = molární absorpční koeficient, l = délka optické dráhy v cm). Jednotka katal (zkratka kat) odpovídá množství enzymu, které katalyzuje za optimálních podmínek přeměnu jednoho molu substrátu za sekundu. Jeden nanokatal (nkat) je 10^{-9} kat.

Výslednou aktivitu POX vztáhneme na g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu (FW) a dále uvádíme v jednotkách kat/g FW. **Specifickou aktivitu (v kat/mg proteinu)** daného enzymu získáte podílem celkové aktivity enzymu v kat/1 ml a koncentrace proteinů v mg/ml. Koncentraci proteinů získáte stanovením proteinů metodou Bradfordové. Z kalibrační křivky BSA určíte koncentraci proteinů ve vzorku v mg/ml.

V případě sledování časového nebo koncentračního vlivu zvoleného stresového faktoru vypracujeme graf s příslušnou závislostí změn produkce NO na sledovaných parametrech.

Katalasa: extinkčního koeficient $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

APX: extinkční koeficient $\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Guajakolperoxidasa: extinkční koeficient $\epsilon = 4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

GPX: extinkční koeficient pro NADPH, $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Kontrolní otázky

- 1) Jakou reakci katalyzuje peroxidasa?
- 2) Do kolika a jakých skupin jsou členěny peroxidasy podle charakteru aktivního místa?
- 3) Vysvětlíte princip stanovení aktivity peroxidasy používaný v dané úloze.
- 4) Jakou další metodu pro stanovení aktivity peroxidasy je možné použít?

Literatura

10. Stanovení izoenzymového zastoupení rostlinných peroxidas elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek

Cíle úlohy:

Cílem této laboratorní úlohy je studium přítomnosti izoenzymů v rostlinném materiálu metodou nativní elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Seznámíte se s principem a obecným experimentálním postupem při dělení proteinů nativní elektroforézou a detekce aktivních isoenzymů pomocí specifických reakcí za tvorby barevných produktů enzymové reakce.. Po absolvování této úlohy byste měli být schopni:

- ✓ popsat obecný princip dělení proteinů při elektroforéze
- ✓ zhodnotit výsledky z pokusů pro detekci isoenzymů peroxidas v rostlinných vzorcích
- ✓ vytvořit hypotézy vysvětlující rozdíly v isoenzymovém zastoupení peroxidas

Úvodní otázky:

- Uveďte příklad alespoň 2 enzymů, jejichž isoenzymové zastoupení je sledováno lidském séru při klinických biochemických testech
- Pokuste se vysvětlit, co je podstatou toxického účinku zvýšených koncentrací peroxidu vodíku v živých buňkách?

I. Teoretický úvod

Peroxidasy (POX, EC 1.11.1.7) jsou enzymy, které redukují peroxidu vodíku (nebo i jiné peroxidy) za současné oxidace další sloučeniny. Mezi nejlepší substráty peroxidas lze řadit fenoly a aromatické aminy. Podle charakteru aktivního místa jsou POX děleny do tří skupin – nejpočetnější skupinou jsou hemové, dále vanadové a ostatní peroxidasy. Obsah sacharidů se u jednotlivých POX velmi liší. Relativní molekulová hmotnost je v rozmezí 42 000-158 000. O peroxidasách je známo, že se vyskytují ve velkém množství forem, např. u křenové peroxidasy je známo celkem 14 forem. Jsou-li tyto formy skutečnými izoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo se jedná o posttranslační modifikace není dosud zcela známo. Dokonce se zvažuje, nejedná-li se i o artificální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či způsobem stanovení. Rostlinné peroxidasy vykazují jasnou příbuznost - peroxidasy křenu, tuřínu, tabáku a brambor jsou homologní v rozmezí 36-50%. Peroxidasy byly nalezeny prakticky ve všech rostlinných pletivech. Mohou být přítomny buď volné (v cytoplazmě, vakuolách, mezibuněčném prostoru) nebo vázané (buněčná stěna, plazmatická membrána, organelové membrány). Vazba může být iontová, ale i kovalentní.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (často označována anglickou zkratkou PAGE, „*polyacrylamide gel electrophoresis*“) patří mezi tzv. elektromigrační metody, které využívají pohybu ionizovaných částic v elektrickém poli. Částice nesoucí náboj rozpuštěné v elektrolytu se v elektrickém poli pohybují konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě. Rychlost pohybu iontů ve stejnosměrném elektrickém poli je přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontu k jeho velikosti a odporu prostředí. Malé částice s velkým nábojem mají velkou mobilitu (pohyblivost), zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní mobilita, tj. mobilita, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, bývá obvykle nižší než teoretická elektroforetická mobilita a je závislá na pH a iontové síle elektroforetického pufru. Změna teploty má vliv na viskozitu prostředí a tudíž i na sílu vnitřního tření. Pokud se ion

pohybuje v roztoku lze odpor prostředí vyjádřit viskozitou. V případě elektroforézy na nosiči je pro odpor prostředí rozhodující např. porozita nosiče nebo interakce iontů s nosičem. Dostatečně odlišná efektivní elektroforetická pohyblivost dělených látek je základním předpokladem pro úspěšnou separaci.

Historicky byla vypracována řada elektromigračních technik a jejich modifikací:

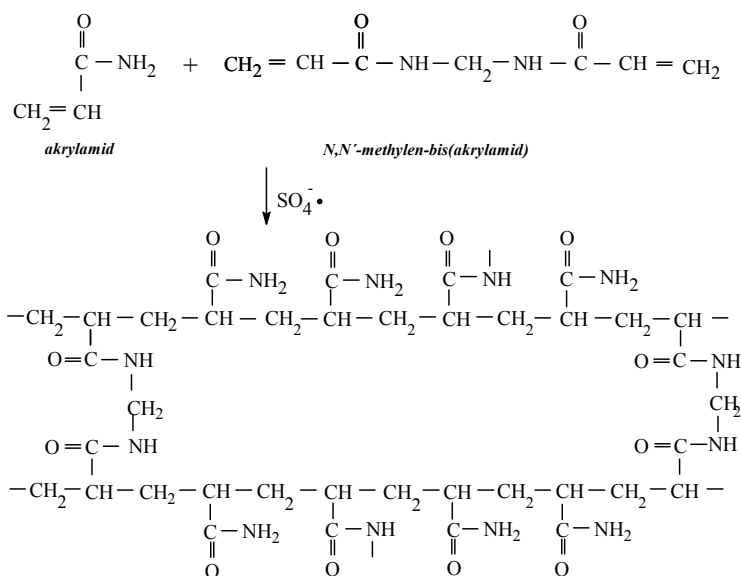
1. elektroforéza s pohyblivým rozhraním neboli volná elektroforéza
2. elektroforéza na nosičích neboli zónová elektroforéza
3. rovnovážná elektroforéza reprezentovaná izoelektrickou fokusací
4. kapilární elektroforéza

Zavedením zónové elektroforézy byly odstraněny problémy související s konvekčním mícháním putujících proteinů a potřeba poměrně velkého množství vzorku. Při zónové elektroforéze se vzorek pohybuje na pevném podkladu (nosiči). Sloupcové uspořádání je typické pro preparativní účely, plošné uspořádání naopak pro analytické účely. Prvními použitými nosiči byly chromatografický papír, acetát celulózy, škrob nebo celulóza. V současné době se používají především gelové materiály, a to agarosový gel, škrobový gel (zřídka) a polyakrylamidový gel. Elektroforetické nosiče musí být hydrofilní, nerozpustné ve vodě a měly by mít co nejméně adsorpčních schopností. Použití porézních gelů umožňuje separaci molekul na principu síťového efektu (velké molekuly jsou zpomalovány více než molekuly malé) a zároveň na základě elektroforetické pohyblivosti.

Běžně používaným nosičem je polyakrylamidový gel, který je inertní, pružný, mechanicky pevný, průhledný a s možností nastavení hustoty zesíťování gelu, gradientu hustoty gelu aj. Gel se připravuje kopolymerizací dvou monomerů akrylamidu ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$; zkratka AA) a N,N'-metylen-bis-akrylamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}=\text{CH}-\text{CH}_2$; zkratka BIS). Kopolymerace probíhá radikálovým mechanismem. Jako iniciační činidlo se používá nejčastěji persíran amonný (ammonium persulfate; zkratka APS) Jako *stabilizátor* volných radikálů se používá N,N'-tetrametyléndiamin (TEMED). Kyslík je inhibitorem polymerace, proto je vhodné polymerační směs před přidáním iniciátoru zbavit kyslíku. Kopolymerizací vzniknou dlouhé lineární řetězce polyakrylamidu, křížově propojené můstky bifunkčního činidla BISu.

Polyakrylamidový gel si můžeme představit jako strukturu sestávající z otevřených pórů určité velikosti, obsahujících kapalinu s pufrem. Velikost pórů je nepřímo úměrná koncentraci bifunkční složky gelu, tedy N,N'-metylen-bis (akrylamidu). Vzájemný poměr obou složek kopolymeru je velmi důležitý a ovlivňuje fyzikální vlastnosti vzniklého gelu. Vyšší koncentrace obou složek vede k získání gelů tuhých a křehkých, nízká koncentrace naopak ke gelům měkkým.

Volba vhodné koncentrace AA a BIS je klíčovou podmínkou k dosažení dobré separační účinnosti gelu. Poměr AA:BIS se může pohybovat v rozmezí 100:1 až 20:1 (zpravidla 40:1). Při nízké celkové koncentraci monomerů (pod 5%) má gel vždy malou mechanickou pevnost, takže není možné s ním manipulovat, což lze pouze částečně napravit snížením poměru AA:BIS až na 20:1. Celková koncentrace monomerů při daném poměru AA:BIS určuje hustotu polymerních vláken v gelu a tím i mechanickou pevnost gelu.



V současnosti pravděpodobně nejpoužívanějším technickým provedením PAGE je diskontinuální elektroforéza. Její název je odvozen od toho, že vzorek putuje po čas separace přes dva gely s různou porozitou a s různými elektrolyty. Nejpoužívanější je modifikace dle Laemmliho. Úkolem prvního gelu (koncentrující; *stacking gel*), obsahujícího velké póry, je zakoncentrování (fokusace) vzorku do úzké zóny. Takto koncentrovaný vzorek vstupuje do dělicího gelu, jehož separační účinnost je pak vysoká bez ohledu na původní objem vzorku. Zaostřovací gel a vzkovovací pufr obsahují Tris-chloridový pufr, jehož pH 6,8 je asi o dvě jednotky nižší než má pufr dělicího gelu. Elektrodotový roztok obsahuje Tris-glycinátový pufr pH 8,3. V prostředí zaostřovacího gelu je nejpohyblivějším aniontem chloridový, pohyblivost komponent vzorku (bílkovin) je menší. Za zónou chloridů následují zóny bílkovin seřazené podle elektroforetických pohyblivostí. Poslední zónu tvoří glycin. Hodnota intenzity proudu je nastavena na určitou konstantní velikost. Seřazené zóny se pohybují stejnou rychlostí, dochází k vzniku ostře ohraničených za sebou těsně následujících zón iontů (uvedený princip je základem další elektromigrační metody - izotachoforézy). Vzhledem k tomu, že rychlost pohybujících se zón je konstantní, vytváří se stupňovitý gradient potenciálu. Projevuje se tzv. „samozaostřující efekt“. Zpozdí-li se některý ion za „svou“ zónou, tj. zónou odpovídající příslušné pohyblivosti, octne se v prostředí s větší hodnotou potenciálu, který ho okamžitě urychlí tak, aby „dohnal“ svou zónu (a naopak). Po vstupu seřazených iontů do dělicího gelu, který má vyšší hodnotu pH, se glycin stává druhým nejpohyblivějším iontem po chloridových iontech a současně v důsledku různé pohyblivosti v gelové matici dochází k rozdělení zón od sebe (dělení podle náboje a velikosti molekul). Pohyb čela se indikuje přidáním nízkomolekulárního barviva (bromfenolové modři) ke vzorku, které vytváří ostrý pruh putující s čelem.

Po skončení elektroforézy je nutné rozdělené bílkoviny detekovat (vizualizovat). Toho lze dosáhnout pomocí barviv, která se s vysokou afinitou vážou na molekuly bílkovin, jako je Amidočerň 10B, Coomassie Brilliant Blue R-250, Ponceau S. Impregnace gelu roztokem barviva a posléze vymytí nespecificky vázaného přebytečného barviva (odbarvení) umožní pozorovat jednotlivé zóny bílkovin jako modré pásy na slabě modrém pozadí. Pomocí 1-anilin-8-naftalensulfonátu lze vizualizovat bílkoviny s použitím fluorimetrické detekce. Po osvětlení zdrojem UV záření lze detekovat zóny bílkovin jako zeleně fluoreskující pruhy na nefluoreskujícím pozadí. Velmi citlivou metodou je detekce bílkovin stříbrem, při níž se z amoniakálního stříbrného komplexu adsorbovaného redukuje kovové stříbro.

Elektroforetická separace probíhající v nedenaturujícím prostředí pro proteiny, kdy si proteiny zachovávají své přirozené vlastnosti (např. enzymatickou aktivitu, sérologické vlastnosti) a jsou děleny podle svého tvaru/velikosti a náboje se využívá při:

1. detekci enzymové aktivity,
2. stanovení isoenzymových spekter,
3. separaci biologicky aktivních molekul.

Z důvodů zachování enzymatické aktivity je nutné při přípravě vzorku (extrakci) provádět všechny kroky při nízké teplotě, poměrně rychle, a případně používat látky blokuující proteasy. Spektrum isoenzymů se mnohdy výrazně liší u rostlin v různých ontogenetických fázích, v různých rostlinných orgánech, proto je zapotřebí rostliny pěstovat za definovaných a kontrolovatelných podmínek a vzorky odebírat z rostlin ve stejné vývojové fázi.

Materiál a chemikálie

1. klíčící rostliny hrachu (etiolovalý i zelený), kukuřice, pšenice, listy rajčete, libovolný rostlinný vzorek
2. roztok komerčně dodávané křenové peroxidasy (konc. 1 mg/ml)
3. extrakční pufr – 0,1 M Tris/HCl, pH 7 (*příprava: 12 g Tris (Mw 121,1) rozpustit ve 600 ml vody, upravit pH na 7 s HCl a doplnit vodou na 1 l, uchovávat při 4°C*)
4. Lowryho činidlo A a B pro detekci proteinů
5. roztoky pro přípravu gelů
 - akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid: 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu
 - 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'-tetrametyléndiamin (TEMED)
 - 10 % (w/v) persíran amonný ((NH₄)₂S₂O₈) - *připravovat vždy čerstvý!*
 - vodou nasycený *n*-butanol
6. elektrodotový pufr: 0,025 mol.L⁻¹ Tris, 0,192 mol.L⁻¹ glycin, pH 8,3
7. 60% roztok glycerol
8. Bromfenolová modř (*příprava: 1 mg bromfenolové modři rozpustit v 5 ml vody, k 2 ml roztoku bromfenolové modři přidat 1 ml 60% glycerolu*)
9. barvicí roztoky
 - barvicí roztok BioSafe (BioRad) pro detekci proteinů
 - roztok s 4-Cl-1-naftolem
 - roztok s pyrokatecholem a *p*-fenylendiaminem
10. kádinky, centrifugační kyvety, ledová lázeň, teflonová míchadla, automatické pipety, Hamiltonova pipeta (50 µL), nalévací stojánek, elektroforetická komůrka, skla pro elektroforézu, mezerníky (spacers), hřebínek, stříčka s destilovanou vodou, stříčka s lihem, třepačka, zdroj pro elektroforézu, chlazená centrifuga.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

UPOZORNĚNÍ:

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

1. Příprava vzorků

1. Na převážkách navažte cca 2g rostlinného materiálu
2. K odváženým semenáčkům přidejte ve vychalzené třecí misce extrakční pufr v poměru 1ml na 1 g váhy, špetku mořského písku a na ledové lázni rozetřete
3. Obsah misky přeneste do centrifugační zkumavky a centrifugujte ve vychlazené centrifuze 15 min centrifugujeme při 12 000 ot/min.
4. Supernatant přeneste do čisté zkumavky a uložte v ledové lázni
5. Vzorek pro elektroforézu připravíte smícháním 0,6ml rostlinného extraktu s 60% glycerolem v poměru 3:1 (v:v).

2. Příprava skel a elektroforetické aparatury

1. Důkladně odmašťte isopropanolem dva páry skleněné desky (s a bez zářezu) .
2. Vložte a upevněte pod dohledem vedoucího skla do nalévacího stojánku.
3. Mezi skla vložte plastový hřebínek a na skleněnou desku popisovačem označte vzdálenost cca 1 cm dolů pod koncem zubů hřebínku a poté hřebínek vytáhněte.

3. Příprava polyakrylamidového gelu

1. Přichystejte si dvě označené kádinky na přípravu zaostřovacího a dělicího gelu.
2. Podle následující tabulky napipetujte jednotlivé roztoky (složky gelu) do příslušných kádinek (*objemy jsou uvedeny v ml*).

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	H ₂ O	TEMED	start APS
8% dělicí	5,2	5	-	9,2	0,02	0,20
4% zaostřovací	1,3	-	2,5	5,9	0,02	0,12

3. Přidávkem čerstvě připraveného roztoku persíranu amonného do kádinky, obsahující komponenty pro dělicí gel, zahajte polymeraci gelu.
4. Připravenou směs po cca 5s promíchání rychle přeneste pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla. V roztoku mezi skly se nesmí objevit vzduchové bubliny. Gel naléváme až po značku na skle (tj. 1 cm pod hřebínek).
5. Gel převrstvěte tenkou vrstvou vodou nasyceného *n*-butanolu.
6. Po cca 15 minutách polymerace slejte *n*-butanol a povrch gelu opláchněte destilovanou vodou ze stříčky a vysušte pomocí filtračního papíru.
7. Po nastartování polymerizace zaostřovacího gelu přidávkem roztoku persíranu amonného přeneste ihned připravenou směs pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla na již zpolymerovaný dělicí gel
8. Do gelu ihned vložte opatrně hřebínek tak, aby pod zuby hřebínku nezůstaly žádné vzduchové bubliny. Stane-li se tak, hřebínek rychle vyjmeme a znovu vsuneme.
Pozor, roztok se stává silně viskózní během několika minut!
9. Po nalití nechte gel 30min tuhnout.

4. Aplikace vzorků

1. Skla s připraveným gelem vložte do elektroforetické komůrky.
2. Popisovačem vyznačte zuby hřebínku a poté hřebínek opatrně vyjměte.
3. Do elektrodové komůrky nalijte pod dohledem vedoucího elektrodový pufr.
4. Dle pokynů vedoucího naneste Hamiltonovou pipetou do jamek 30 μ l vzorků. Krajiní jamky, ve kterých dochází k deformaci zón, použijte pro aplikaci směsi bromfenolové modři s glycerolem v poměru 3:1 (v:v), která je důležitá pro monitorování průběhu elektroforézy.
5. Před uzavřením aparatury odstraňte vzduchové bubliny na spodní hraně desek.

5. Vlastní elektroforetické dělení

1. Komůrku pro elektroforézu uzavřete víkem a připojte ke zdroji.
2. Na zdroji nastavte konstantní napětí 100 V a spusťte zdroj hlavním vypínačem.
3. Jakmile zóna bromfenolové modři doputuje na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu nastavte zdroj na konstantní napětí 180 V.
4. Po doputování zóny bromfenolové modři téměř na úroveň dolního okraje skla vypněte zdroj napětí.
5. Odstraňte víko a vylijte do odpadu elektrodový pufr.
6. Pomocí plastové špachtle oddělte skla od gelu a gel označte odkrojením levého dolního rohu (nutné pro orientaci ve vzorcích při vyhodnocování gelu).

Sledováním laboratorního postupu do tohoto bodu jste provedli rozdělení proteinů obsažených ve vzorku metodou nativní elektroforézy ve dvojím opakování. Jeden z výsledných gelů použijete pro specifickou detekci proteinů, druhý gel pro specifickou detekci peroxidasové aktivity s 2 různými substráty.

6. Detekce proteinů na gelu

1. Přeneste gel do připravené nádoby s barvicím roztokem BioSafe a inkubujte na třepačce 1 hod
2. Slijte barvicí roztok do určené nádoby a gel opláchněte několikrát destilovanou vodou
3. Umístěte gel do fixačního roztoku a pozorujte vývoj zbarvení

7. Detekce peroxidasové aktivity na gelu

1. Přeneste gel do připravené nádoby obsahující cca 15 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7
2. Po 5 min opatrně odlijeme pufr, tak aby gel nevypadl do výlevky
3. Přidáme připravený barvicí roztok a necháme inkubovat 15 – 30 min na třepačce a kontrolujeme vývoj zbarvení
4. Po dosažení požadovaného vývoje zbarvení gelu slijte barvicí směs a gel několikrát propláchněte destilovanou vodou.

Vyhodnocení výsledků:

- a) Izoenzymové zastoupení peroxidas ve vzorcích dokumentujeme naskenovaným gelem opatřeným popisky vzorků.
- b) Do tabulky přehledně uveďte počet pozorovaných izoenzymů u studovaných rostlin a jejich relativní mobilitu - porovnejte výsledky získané použitím dvou rozdílných barvicích systémů.

Kontrolní otázky:

- a) Jaký vliv bude mít na rychlost pohybu proteinů v gelu následující změny experimentálních podmínek: zvýšení obsahu bisakrylamidu, zvýšení napětí zdroje, snížení teploty elektrodového pufru, zvýšení koncentrace proteinů ve vzorku.
- b) Vyhledejte v literatuře, co jsou to protilátky konjugované s křenovou peroxidasou a jaké je jejich využití v biochemických experimentech.

Literatura:

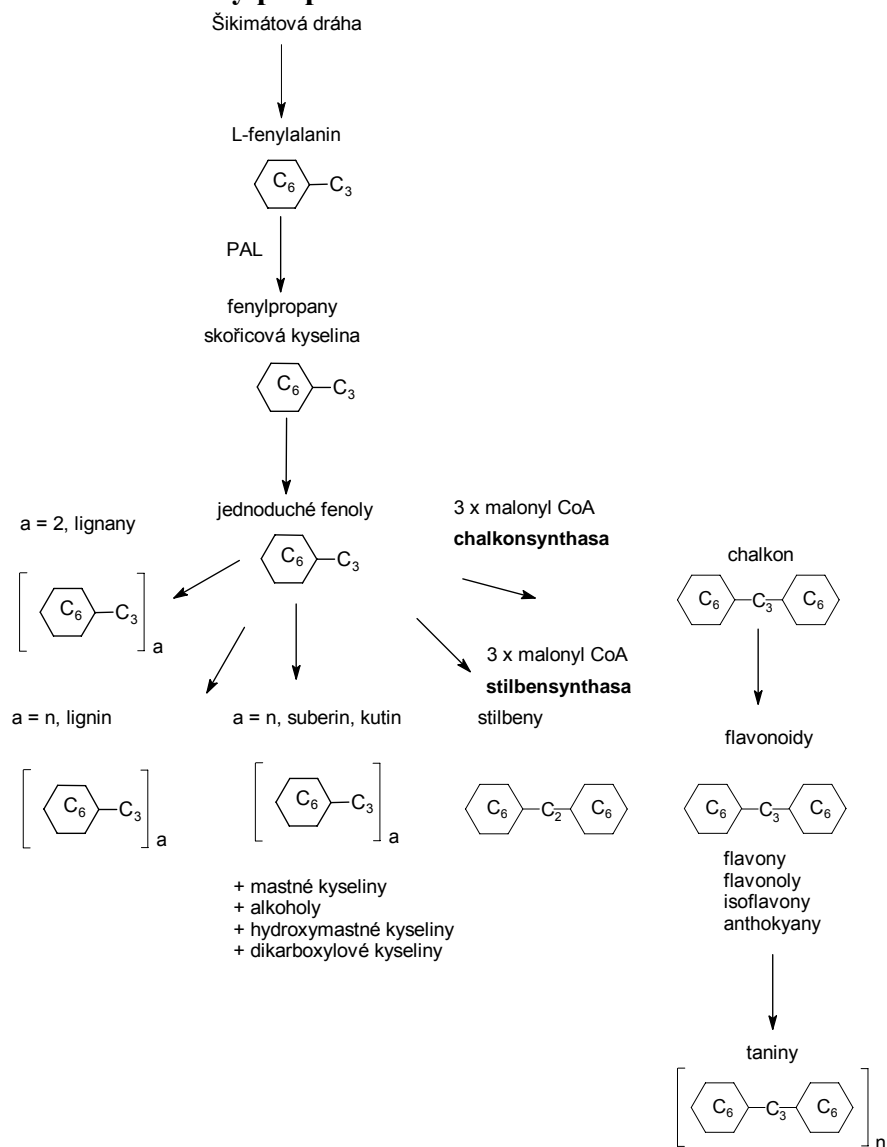
1. Ferenčík M. a kol. (1981) : Biochemické laboratorne metódy, Alfa – VTEL, Bratislava
2. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.(2001): Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, Chem. Listy 95, 212-222
3. Pingoud A. et al.(2002): Biochemical Methods, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

11. Stanovení aktivity fenylalaninamoniaklyasy. Lokalizace produkce fenolických látek ligninu v rostlinném pletivu

Fenylalaninamoniaklyasa (PAL, EC 4.3.1.5) patří mezi intenzivně studované enzymy sekundárního metabolismu rostlin díky své úloze klíčového enzymu, jež katalyzuje první krok fenylpropanoidové cesty. PAL je indukovaná celou řadou stresových faktorů a lze tedy studovat závislost její exprese a aktivity na intenzitě stresových faktorů a obranné reakce. Rostliny obsahují velké množství fenolových derivátů, které zahrnují jak jednoduché fenoly, tak fenylpropanoidy (flavonoidy, stilbeny, taniny, ligniny, suberin a kutin).

Fenylalaninamoniaklyasa katalyzuje počáteční reakci metabolismu fenylpropanoidů deaminací L-fenylalaninu za vzniku kyseliny *trans*-skořicové. Následnou hydroxylací katalyzovanou *trans*-cinnamát-4-monooxygenasou (EC 1.14.13.11) vzniká kyselina 4-hydroxyskořicová, která je prekurzorem fenolových kyselin (např. kyseliny kávové, ferulové a sinapové). Může také vznikat přímo, deaminací tyrosinu jako druhého substrátu. Enzym je pak nazýván tyrosinamoniaklyasa (TAL). Phe a Tyr vznikají šikimátovou cestou .

Tvorba látek fenylpropanoidového metabolismu



PAL je především přítomna u vyšších rostlin, některých hub a prokaryot. V živočišných tkáních se nevyskytuje. U mikroorganismů má katabolickou funkci a dovoluje jim tak využít L-Phe jako jediný zdroj uhlíku. Nejčastěji se vyskytuje jako tetramer (zřídka dimer) s podjednotkami od 77 do 83 kDa, které se mohou navzájem lišit, být identické nebo se vyskytovat jako 2 α a 2 β podjednotky.

Aktivita PAL je primárně regulována na úrovni genové exprese. Další regulační mechanismy jsou zpětnovazebná aktivace, inhibice produkty větví fenylpropanoidové cesty, enzymová inaktivace a fosforylace.

Ačkoliv PAL byla původně považována za rozpustný cytosolární protein, její přítomnost byla také prokázána ve frakcích mikrosomů, peroxisomů, glyoxysomů a chloroplastů.

Spektrofotometrické stanovení aktivity PAL:

Metoda určení aktivity PAL, kterou se budeme zabívat, je založena na základě změny absorbance (vznik kyseliny *trans*-skořicové/*t*-CA) při 290 nm. Absorpční maximum *t*-CA je při 275 nm. Všechna spektrofotometrická měření budou proto prováděna při této vlnové délce. Reakční směs obsahuje extrakt PAL, pufr o definovaném složení a pH, substrát (L-Phe). Po inkubaci a ukončení reakce přidávkem příslušné kyseliny bude směs centrifugována a v supernatantu bude změřena absorbance při 275 nm vůči blanku s využitím mikrodestičkového readru. Aktivita PAL bude vypočtena s využitím Lambert-Beerova zákona.

Praktická část: Stanovení aktivity fenylalaninamoniaklyasy

Materiál a chemikálie: Listy rajčete nebo salátu, zásobní pufr: 150mM Tris-HCL pH 8.8; Polyvinylpyrrolidon (PVP); 2-Merkaptoethanol (2-MeSH); *trans*-skořicová kyselina (*t*-CA), M = 148, 161; 5M HCl (4,43 ml 35 % HCl do 10 ml vody); 100 mM L-fenylalanin (L-Phe) M=165,191 g/mol (82,9mg L-Phe v 5 ml pufru) uschovat (-20°C); 100 mM D-fenylalanin (D-Phe) (82,9 mg L-Phe v 5 ml pufru)

Materiál: třecí miska s tloučkem, písek, miska s ledem, nylonová síťka, ependorfky, 96-jamková destička pro měření v UV oblasti, odměrná baňka,

Přístroje: chlazená centrifuga, reader mikrotitračních destiček PowerWave XS, software Gen5, vodní lázeň, jadnokanálové pipety

1) Stanovení kalibrační křivky s kys. *trans*-skořicovou

1) Připravte 10 mM zásobní roztok kyseliny *trans*-skořicové: do 10 mL odměrné baňky odvažte 14,8 mg *t*-CA a doplňte do 10 mL zásobním Tris-HCl pufr

2) Postupným ředěním si připravte do 1,5 mL ependorfek ze zásobního roztoku *t*-CA roztoky o objemu 1 mL a koncentraci 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 a 0,1 Mm *t*-CA (celkem 5 standardů), řed'te opět zásobním pufr

3) 200 μ L standardu přepipetujte v dubletu na 96-jamkovou destičku pro měření v UV oblasti a na readru změřte absorbanci při 275 nm

2) Příprava extraktu z listu rajčete (salátu)

1) Připravte extrakční pufr: v 50 mL plastové zkumavce rozpust'te 200 mg polyvinylpyrrolidonu (1 % PVP ve výsledné koncentraci) a 1,6 μ L merkaptoethanolu (1mM MeSH ve výsledné koncentraci) do 20 mL zásobního Tris-HCl pufru

2) Listy rajčete (cca 1-2 g) homogenizujte ve vychlazené třecí misce (miska stojí v ledu) s vychlazeným extrakčním pufr (na 1g rostlinného materiálu 2 ml pufru) a mořským pískem

3) Vzniklý produkt přefiltrujte přes nylonovou síťku do 2 ml ependorfky

- 4) Homogenát centrifugujte 15 minut při 15 000 x g ve vychlazené centrifuze (4°C)
- 5) Supernatant přepitujte do čisté zkumavky a uložte na ledové lázni

3) Měření aktivity se substrátem L-fenylalaninem, jako blank D-fenylalanin

- 1) Do 0,5 ml ependorfy napipetujte 250 µL extraktu a 200 µL zásobního 150 mM Tris-HCl pufru
- 2) Reakci zahajte přídavkem 25 µL 100mM L-fenylalaninu (výsledná koncentrace 5 mM)
- 3) Jako blank napipetujte 250 µL extraktu, 200 µL zásobního 150 mM Tris-HCl pufru, 25 µL 100mM D-Phe k němuž ihned přidejte 25 µL 5M HCl – uložte do lednice po dobu inkubace
- 4) Vzorky nechte inkubovat 1 hod při 37 °C
- 5) Reakci ukončete přídavkem 25 µL 5M HCl (kromě blanku)
- 6) Proveďte centrifugaci 10 minut při 15 000 x g
- 7) Na destičku napipetujte 200 µL supernatantu a změřte absorbanci vůči blanku při 275 nm (destičky pro měření v UV oblasti)

Vyhodnocení:

- 1) vytvořte kalibrační křivku t-CA a určete rovnici lineární regrese
- 2) z rovnice vypočítejte koncentraci t-CA ve vzorcích
- 3) určete aktivitu vzorku:

Histochemická lokalizace ligninu

Materiál a chemikálie:

semenáčky hrachu, vibratom, žiletka, Petriho misky, štětce, lepidlo, parafilm, podložní a krycí sklíčka, mikroskop
agarosa, destilovaná voda, 20mM K-fosfátový pufr pH 7, fluoroglucinol, 50% glycerol,

postup:

- 1) Připravte 4 % agarosu (4 g agarosu do 100 ml vody, rozvařit)
- 2) Žiletkou nařežte 0,5 cm segmenty stonku hrachu
- 3) Agarosu (40 °C) vlejte do Petriho misky a segmenty stonku vložte kolmo do agarosu
- 4) Po zatuhnutí vyřežte skalpelem kvádr agarosu 1,5 cm x 1,5 cm se stonkem uprostřed, ten upravte do tvaru pyramidy a základnu přilepte na základní kostku vibratomu
- 5) Podle pokynů vyučujícího připravte řezy 50 – 100 µm, které pomocí štětce přeneste do Petriho misky obsahující 20mM K-fosfátový pufr, pH 7
- 6) Na parafilm přeneste 3 řezy, ke kterým přidejte velkou kapku fluoroglucinolu nebo pufru (kontrola) a inkubujte 10 minut
- 7) Poté odsajte roztok a řezy 3x propláchněte destilovanou vodou
- 8) Řezy přeneste do kapky 50 % glycerolu na podložním skle a uzavřete krycím sklíčkem
- 9) Mikroskop před použitím očistěte od prachu. Preparát upevněte na stolek a seřídte si mikroskop **podle instrukcí uvedených v teoretické části**. Pro fotodokumentaci použijte digitální kameru a počítač. Vytvořte soubor do kterého budete ukládat fotografie. Otevřete program pro fotografování. Pro orientaci v dokumentaci označte fotky číslem a datem, zvětšením a charakterem vzorku. Do záznamového sešitu uveďte použitý objektiv a popis sledovaného objektu.

12. Stanovení volných a vázaných fenolů v rostlinných extraktech.

Chemikálie: kyselina kávová, metanol, deionizovaná voda, Folin-Ciocalteuovo činidlo, 5 % uhličitan sodný (5 g Na₂CO₃ na 100 mL vody), mořský písek

Materiály: listy zeleného a ethiolovaného hrachu, ependorfky 1,5 mL, třecí miska s tloučkem, odměrná baňka s objemem 10 mL, miska s ledem, 96-jamková destička pro měření ve viditelné oblasti (průhledná se žlutým pruhem), jednokanálové pipety, váhy, termostat, centrifuga, Reader mikrotitračních destiček PowerWave XS, software Gen5

A) Příprava standardu:

- 1) připravte zásobní roztok (1 g/L): v 10 mL odměrné baňce rozpustit 10 mg kyseliny kávové a 1 mL metanolu a doplnit deionizovanou vodou na 10 mL.
- 2) připravte koncentrační řadu 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 mg/L ředěním zásobního roztoku vodou (stačí připravit od každé koncentrace objem 1 mL, 0 mg/L = Blank (voda))

B) Extrakce fenolů ze vzorku:

- 1) rostlinný materiál homogenizujte v třecí misce v 50% metanolu v poměru 1:6 (g čerstvé váhy/ml metanolu) s trochou mořského písku
- 2) směs rozdělte do několika ependorfeč a nechte inkubovat v termostatu při teplotě 90 °C po dobu 90 minut
- 3) vzorek centrifugujte 15 minut při 14 000 g
- 4) do čisté ependorfky přepipetujte supernatant obsahující extrahované volné fenoly

C) stanovení volných fenolů:

- 1) do ependorfeč napipetujte 100 μL vzorku, standardu nebo Blanku
- 2) přidejte do všech ependorfeč 100 μL Folin-Ciocalteova činidla a dobře protřepejte
- 3) přesně po 2 minutách přidejte do všech ependorfeč 800 μL 5 % (w/v) roztoku uhličitanu sodného
- 4) směsi protřepejte a nechte inkubovat při 40 °C po dobu 20 minut
- 5) poté směsi rychle ochlaďte v ledu, rozpipetujte na 96-jamkovou destičku (200 μL do jamky) a změřte absorbanci kyseliny kávové při 740 nm

Literatura:

(F-C mikrometoda, podle Cicco et al. (2008) *Microchemical J*91, 107-110)

13. Stanovení volných a konjugovaných polyaminů

Teoretický úvod

Alifatické polyaminy jsou nízkomolekulární organické polykationty vyskytující se ve všech typech prokaryontních a eukaryontních organismů. V rostlinách jsou obecně za nevýznamnější polyaminy považovány diamin putrescin (Put, 1,4-diaminobutan), triamin spermidin (Spd, 1,8-diamino-4-azaoktan) a tetraamin spermin (Spm, 1,12-4,9-diazadodekan). I když jejich přesná funkce v rostlinných buňkách a organelách není zcela vyjasněna, jsou tyto polyaminy účastníky důležitých fyziologických a vývojových procesů jako buněčné dělení, diferenciaci a růst. V případě rostlin se polyaminy podílejí na regulaci embryogeneze, senescence, vývoje květů, zrání plodů a také obranných a adaptačních mechanismů při různých typech biotického a abiotického stresu. Často vyskytujícími se polyaminy jsou také 1,3-diaminopropan (Dap), produkt oxidačního odbourávání Spd a Spm, a kadaverin (Kad, 1,5-diaminopentan), hojně se vyskytující v rostlinách čeledi Fabaceae. Polyaminy jsou také důležitými prekursory biosyntézy alkaloidů u více než 50 rostlinných rodů.

Kromě této velmi rozsáhle studované skupiny polyaminů a jejich metabolismu se v podlé výzkumů posledních let v rostlinách vyskytují také tzv. „nevšední“ polyaminy. Jedná se o lineární a větvené tri-, tetra-, penta- a hexaaminy (viz tab.1), vyskytující se zejména u extremofilních bakterií, ale nalezené také u dalších bakterií, řas, hub a vyšších rostlin. Tyto nevšední polyaminy mají pravděpodobně vztah k odolnosti a adaptaci organismů na stresové podmínky jako salinita, teplo a sucho. Biologická aktivita polyaminů je odvozena zejména od jejich bazických vlastností, díky které interagují s anionickými skupinami nukleových kyselin, proteinů, fosfolipidů, pektických polysacharidů

V rostlinách se polyaminy vyskytují také ve formě konjugátů, z nichž nejvýznamnější jsou amidy fenolických kyselin a polyaminy vázané na proteiny. Nejčastější formou fenolických konjugátů jsou amidy kys. hydroxyskořicové, které mohou mít bazickou nebo neutrální formu, podle toho zda je amidová vazba vytvořena na obou primárních aminových skupinách. Tvorba konjugátů polyaminů s proteiny je katalyzována specifickými enzymy transglutaminasami. Ty se nacházejí především v chloroplastech, kde se předpokládá regulační mechanismus účinnosti komplexu světloběrných antén prostřednictvím konjugace s polyaminy. Za určitých podmínek mohou právě konjugované formy představovat hlavní frakci celkového poolu polyaminů některých rostlinných organel, což je třeba mít na zřeteli při volbě vhodných extrakčních a analytických metod pro jejich analýzu.

Extrakce PA z rostlinného materiálu

Extrakce volných PA se obvykle provádí 5-10% nebo 1M roztokem kyseliny chloristé, trichloroctové nebo chlorovodíkové. Extrakce je spojena s homogenizací rostlinné tkáně v příslušném extrakčním roztoku v mechanickém homogenizátoru, sonikací ultrazvukem nebo je možno povést předběžnou homogenizaci po zmrazení kapalným dusíkem a poté extrakci. Nerozpustný podíl po centrifugaci vzorku je obvykle podroben druhé extrakci a výsledné supernatanty spojeny. Rozpustný extrakt je vhodné podrobit před vlastní analýzou frakcionaci (např. extrakcí na pevné fázi) pro oddělení bazických polyaminů od neutrálních a kyselých látek interferujících s jejich analýzou (zejména aminokyseliny a cukry). Fenolické konjugáty PA lze stanovit jako takové, což vyžaduje složitější protokoly s organickými rozpouštědly pro neutrální a použití extrakcí na pevné fázi pro kvantitativní extrakci skupiny bazických konjugátů. Alternativně je možno PA uvolnit z konjugátů hydrolyzou v 6M HCl. Protože díky své silné bazicitě se PA často silně a ireverzibilně váží na nejrůznější chromatografické sorbenty a také povrchy plastových, skleněných nádob a kapilár, je doporučeno používat pro zjištění experimentálního výtěžku extrakce vhodný polyaminový vnitřní standard, kterým je obvykle 1,6-diaminohexan nebo 1,7-diaminoheptan, které se přirozeně nevyskytují.

Kromě alifatických polyaminů se v rostlinách vyskytují další 2 významné skupiny látek aminových látek – aromatické polyaminy a alifatické monoaminy, jejichž význam a analýza nejsou předmětem této úlohy.

Purifikace extraktů

U některých vzorků může být vhodné před vlastní analýzou provést chromatografickou purifikaci extraktu. Obvyklým postupem je použití silného katexu, vymytí kyselých a neutrálních látek vodou a postupné eluce skupin aminů pomocí 1-6N HCl. Obdobně lze aplikovat silný aniont a eluci roztokem NaOH, což může být výhodou při následném použití derivatizační metody v alkalickém prostředí. Modernější metodou je tzv. extrakce na pevné fázi, která je používá připravené komerční minikolonky se silným katexem nebo reverzní fázi na vysoce odolném polymerním nosiči, které umožňují rychlé a efektivní dělení směsi látek na základě jejich polarity a acidobazických vlastností.

Přímé stanovení PA

Přímé stanovení volných PA bez přípravy vhodných derivátů představovalo do nedávné doby obtížně řešitelný experimentální oříšek. Polyaminy neabsorbují v rozsahu UV-VIS a nelze je detekovat obvyklými typy spektrofotometrických nebo fluorometrických detektorů. Nové možnosti přinesla dostupnost elektrochemických detektorů pracujících na principu pulsní amperometrické detekce, ty však nejsou v praxi příliš rozšířeny a zatím byly většinou aplikovány na vzorky z živočišných tkání. Teoreticky lze vhodně detekovat polyaminy chromatografickými analýzami spojenými s hmotnostní detekcí, ovšem díky vysoké polaritě a bazicitě a vyplývající nulové retenci na reverzní fázi nelze použít typické upořádání LC-MS s ionizací elektrospřejem. Efektivně lze volné PA rozdělit na koloně katexu, použité anorganické pufrů ale opět nejsou kompatibilní s většinou hmotnostních spektrometrů. Velmi slibné je v tomto směru použití metody kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí.

Historicky široce používanou a osvědčenou metodou pro kvalitativní a semikvantitativní stanovení PA patří chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Obvyklé provedení TLC polyaminů na silikagelových deskách zahrnuje použití silně bazické organické mobilní fáze (např. aceton-amoniak 4:1), která zaručuje určitou pohyblivost Sp_d, Sp_m a vyšších PA přes jejich velice silnou vazbu na kyselé skupiny silikagelu. Skupiny polyaminů mohou poté být detekovány specifickými detekčními činidly – např. primární aminoskupiny ninhydrinem, sekundární nitroprussidem sodným a terciární Dragendorffovým činidlem.

Stanovení derivátů PA

V závislosti na sledovaném analytu, typu vorku, dostupném přístrojovém vybavení a cenové náročnosti je možno vybrat si z celé řady metod používajících chemickou derivatizaci primární nebo sekundární aminoskupiny polyaminů.

Mezi nejčastěji používanými deriváty PA lze vyčlenit 3 významné skupiny:

- a) volatilní deriváty pro GC-MS** – např. heptafluorobutylderiváty polyaminů ...
- b) fluorescenční deriváty** – např. derivatizace dansylchloridem, o-ftaldehydem ...
- c) deriváty absorbující v UV-VIS** – např. derivatizace benzoylchloridem, dansylchloridem ..

Připravené deriváty lze poté analyzovat celou řadou chromatografických a elektroforetických metod, z nichž největšího praktického použití dosáhly tenkovrstvá (TLC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). TLC je vhodná metoda pro rychlé a na přístrojové vybavení kvalitativní a semikvantitativní stanovení polyaminů. Fluorescenční deriváty PA lze vhodnou mobilní fází na tenké vrstvě rozdělit a poté při osvětlení UV lampou vyhodnotit obsah pomocí digitální kamery a příslušného softwaru densitometricky. Metoda HPLC je daleko citlivější

(zejména při použití fluorescenčních derivátů PA), přesnější a robustnější, ale také vyžaduje drahé přístrojové vybavení a vyškolený personál.

Ve cvičení použitá metoda stanovení benzoylesterů je jednou ve výzkumné i analytické praxi z nejčastěji používaných. Využívá reakci primárních aminoskupin polyaminů s benzoylchloridem v alkalickém prostředí. Výsledné benzoylestery absorbují v UV oblasti s maximy při 224 a 254 nm. Pro stanovení se obvykle používá detekce při 254nm, kde méně absorbují vedlejší produkty benzoylační reakce methylbenzoát a benzanhydrid. Při reakci také vzniká kys. benzoová, která se do roztokové fáze extrahuje v zanedbatelném množství, ale může opět vznikat hydrolyzou po rozpuštění odpařených etherických extraktů v mobilní fázi pro HPLC.

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 připravit pouze z deionizované vody a bezprostředně před použitím přefiltrovat 40µm filtrem Millipore.

Standardy polyaminů

Dap, Put, Kad, Spd, Spm, Dahx – všechny 1mM roztoky v deionizované vodě

Benzoylační činidlo (připravuje se vždy čerstvě)

100 µl benzoylchloridu + 100 µl methanolu pro HPLC

Nasycený roztok NaCl -připraven v zásobní láhvi (cca 357g/l)

2M NaOH- připraven v zásobní láhvi

5% kys. trichloroctová (TCA) – příprava rozpuštěním 1,0 g krystalické TCA ve 20 ml H₂O

Diethylether – pracujeme vždy v digestoři. Vypočítané množství potřebné pro extrakci všech vzorků si odlejeme ze zásobní láhve do kádinky a z té pipetujeme do plastových zkumavek.

HPLC systém „Gold“ Beckman

126NM – HPLC pumpa A a B, 168NM - Detektor UV/VIS s diodovým polem

injektor Rheodyne s injekční smyčkou o objemu 20 µl

HPLC kolona - Supelco C18 (5µm), 250 x 4.6 ID mm

Mobilní fáze - MeOH (čistota HPLC), **deionizovaná voda** - přefiltrovaná na 40 µm Millipore filtru

Postup

Část 1 – Příprava standardů a vzorků

1. Extrakce polyaminů kyselinou trichloroctovou – Odvážený vzorek rostlinné tkáně homogenizujeme v 10ml plastové zkumavce s čerstvě připravenou 5%TCA, v poměru cca 4ml TCA na 1g rostlinné tkáně. Po skončení homogenizační nástavec důkladně očistíme destilovanou vodou!
2. Homogenizované vzorky dále extrahujeme sonikací 2 min na ultrazvukové lázni.
3. Homogenát přeneseme do 1,5ml eppendorfek a centrifugujeme 5min na 12000 rpm (stolní chlazená centrifuga v laboratoři 515).
4. Derivatizace polyaminů – Do čisté plastové 10ml zkumavce se šroubovací uzávěrem napipetujeme:
 - blank: 1ml 5% TCA jako slepý vzorek

- standardy: 100µl polyaminového standardu a 900µl 5% roztoku TCA
 - 1ml supernatantu rostlinného extraktu a 100µl standardu Dahx jako vnitřní standard
- Do všech zkumavek přidáme 2ml 2M NaOH a 10µl čerstvě připraveného benzoylačnického činidla, ihned důkladně promícháme (3x10s vortex) a nechat stát 30min při laboratorní teplotě.
5. Extrakce benzoylinderivátů – do každé zkumavky k reakční směsi přidáme 2ml nasyceného roztoku NaCl a 2ml diethyletheru, promícháme (3 x 10s vortex) a centrifugujeme 10min při 4.000xg (centrifuga Rotanta v přípravce) při laboratorní teplotě pro oddělení etherové a vodné vrstvy.
 6. Opatrně odebereme 1.5 ml horní etherové vrstvy do 1,5ml eppendorfky. Etherovou frakci necháme odpařit v digestoři ve vyhřívacím bloku při 45°C. Takto připravené benzoylinderiváty jsou při uložení ve tmě a chladu stále řádově týdny.

Část 2 – HPLC analýza

1. **Příprava vzorku** - k odparku benzojlovaných polyaminů přidáme 100µl použité mobilní fáze pro HPLC (55% MeOH), sonikujeme 10min v polystyrenovém plováčku na ultrazvukové lázni a centrifugujeme 5min na 12.000 rpm (stolnicentrifuga v laboratoři mol. biologie)
2. **Příprava přístroje** – pod dohledem vedoucího cvičení spustíme postupně pumpy, detektor a řídicí PC.
3. 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 písty (pozice trojcestného ventilu „Prime Pumps“) pump A a B a poté pumpy propláchneme každou 1min při průtoku 10ml/min (ventil v pozici „Operate“).
4. Nastavíme složení mobilní fáze na 55%, uzavřeme odpadní ventil a bez zapojené HPLC kolony průtokem 5ml/min propláchneme detektorovou celu.
5. Nastavíme průtok na 0,5ml/min a zapojíme použitou HPLC kolonu – pozor na **zapojení ve správném směru**, naznačeném graficky šipkou na těle kolony!
6. Kolonu necháme propláchnout po dobu 10min. Správnou funkci kolony a výstup signálu detektoru zkontrolujeme pomocí funkce „Preview“.
7. Otevřeme uloženou metodu „C18benzo.met“ s parametry průtok 0,8ml/min, výchozí složení mobilní fáze 55% MeOH, gradient z 55% na 65% od 5:00min do 10:00 min a zpět gradient na 55% od 15 do 17min, konec analýza ve 20min.
8. 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“
9. Otočíme injekční ventil do polohy „Load“ (nahore), pomocí Hamiltonovy stříkačky **s tupým koncem** nastříkne do smyčky o objemu 20µl objem cca 50 µl vzorku (pro dosažení dokonalého naplnění kapiláry vzorkem) a otočením ventilu dolů do polohy „Inject“ spustíme vlastní analýzu.
10. Po skončení běhu HPLC provedeme analýzu chromatogramu při vlnové délce 254nm tlačítkem „Analyze“ a odečteme hodnoty retenčního času a plochy chromatografických píků.
11. Provedeme postupně analýzu standardů a vzorků nástřikem 20µl roztoku příslušného benzojlovaného polyaminu v použité mobilní fázi.

Vyhodnocení

- 1) Provedem analýzu a srovnáním retenčních časů chromatografických píků při vlnové délce 254nm identifikujeme polyaminy ve vzorku rostlinné tkáně.
- 2) Vypočítáme hodnotu koncentrace polyaminů nalezených ve vzorku metodou 1-bodové kalibrace srovnáním ploch příslušných chromatografických píků.

Literatura

Bouchereau A. et al. (2000): Analysis of amines in plant material, *J Chromatography B* 747 , 49-67

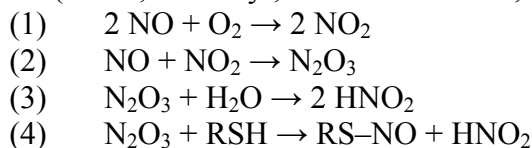
G . Taibi et al . (2000) : Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens, *J . Chromatogr.B* 745 , 431– 437

14. Stanovení nízkomolekulárních a proteinových S-nitrosothiolů v rostlinných extraktech

Teoretický úvod

Oxid dusnatý působí jako signální molekula prostřednictvím cGMP-dependentních a cGMP-independentních drah. Ovlivňování funkce proteinů pomocí S-nitrosace představuje důležitý mechanismus nezávislý na cGMP. S-Nitrosace je zahrnuta v buněčné signalizaci i patologii, S-nitrosothioly velkou měrou zprostředkovávají jak fyziologické, tak patofyziologické účinky NO. S-Nitrosace je reakce probíhající bez enzymové katalýzy. Jedná se o reversibilní kovalentní vazbu –NO skupiny na –SH skupinu cysteinu v cílovém proteinu (Hoffmann et. al., 2003). Na S-nitrosaci se podílí exogenní donory NO, inducibilní i konstitutivní formy NOS (Gow et. al., 2002).

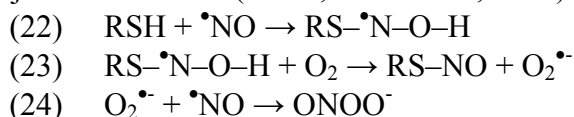
S-Nitrosace cysteinu v proteinu byla poprvé popsána v roce 1992 na S-nitrosoalbuminu (NO-BSA) cirkulujícím v krvi jako hlavní transportní forma NO (Stamler et. al., 1992). Od té doby byla v biologických systémech objevena řada proteinů podléhajících S-nitrosaci; jejich počet stoupá v souvislosti s rozvojem nových a citlivějších metod pro jejich detekci. S-Nitrosothioly vznikají buď reakcí donoru nitrosylu (NO^+) s volným thiolem (Obr. 4), nebo transnitrosylační reakcí mezi S-nitrosothiolem a aminokyselinou, peptidem či proteinem s volnou thiolovou skupinou (Akhter et. al., 2003). S-Nitrosace představuje komplikovanější chemický proces, u kterého lze předpokládat více mechanismů. Při pH 7 NO sám od sebe s thioly za vzniku S-nitrosothiolů nereaguje. Na základě S-nitrosace pozorované v přítomnosti kyslíku lze předpokládat, že probíhá prostřednictvím tvorby oxidů dusíku, např. N_2O_3 a N_2O_4 , dimeru NO_2 . Nejčastěji uvažovaný mechanismus lze popsat následujícími rovnicemi (18-21; R – alkyl; Kharitonov et. al., 1995):



Oxid dusnatý je v přítomnosti kyslíku oxidován za vzniku NO_2 (18), který reaguje s další molekulou NO (19). Vznikající N_2O_3 rychle podléhá hydrolýze (20), ale může být také donorem NO pro –SH skupinu (21). Takto mohou být S-nitrosylovány thioly, např. cysteinová residua sérového albuminu a glutathionu, za vzniku S-nitrosothiolů (Akhter et. al., 2003). Rychlost-určujícím krokem u tohoto mechanismu je reakce NO s kyslíkem a tvorba nitrosačních činitelů (Kharitonov et. al., 1995).

S-Nitrosothioly mohou dále vznikat reakcí thiolu s NO^+ (Boese et. al., 1995), který se uvolní z dinitrosyl-železnatých komplexů, nebo reakcí thiolu s peroxydusitanem (ONOO^- ; van der Vliet et. al., 1998), který se tvoří při reakci NO se superoxidem (O_2^-).

Jiný mechanismus, zvažovaný za fyziologických koncentrací NO, lze popsat následujícími rovnicemi (22-24; Gow et. al., 1997):



Při takto uvažovaném mechanismu NO přímo reaguje s thiolem za vzniku radikálového meziprojektu (22), který může být v přítomnosti akceptoru elektronů, např. molekulárního kyslíku, redukcí akceptoru přeměněn na S-nitrosothiol (23). Vznikající superoxid reaguje s další molekulou NO za vzniku peroxydusitanu (24). Popsaný

mechanismus tvorby S-nitrosothiolů probíhá i v anaerobních podmínkách za přítomnosti akceptoru elektronů, např. NAD^+ (Gow et. al., 1997).

Zůstává nejasné, který z popsaných mechanismů převládá *in vivo*, a za jakých podmínek se tak děje. Stejně tak není zcela objasněno, čím je způsobena vysoká specifita S-nitrosace. Obvykle dochází k S-nitrosaci pouze jednoho cysteinového residua z mnoha přítomných (Derakhshan et. al., 2007).

Ustálená koncentrace S-nitrosovaného proteinu v buňce je určena mírou S-nitrosace a denitrosace. S-Nitrosothioly jsou nestabilní a velice snadno podléhají neenzymové degradaci redukčními činiteli přítomnými v cytosolu. Je pravděpodobné, že neenzymová denitrosace následuje ihned po S-nitrosaci proteinů v redukčním prostředí cytosolu. Hladina některých S-nitrosothiolů je přímo regulována intracelulární koncentrací glutathionu (Clementi et. al., 2008). K denitrosaci proteinů může dojít i enzymově S-nitrosoglutathionreduktasou (Liu et. al., 2001) nebo transnitrosační reakcí mezi S-nitrosovaným proteinem a thioredoxinem (Mitchell et. al., 2007).

Byla identifikována i malá skupina nezvykle stabilních S-nitrosothiolů (Paige et. al., 2008); S-nitrosace v těchto případech pravděpodobně vede k takové změně konformace proteinu, která chrání nitrososkupinu před přístupem redukčních činitelů.

Provedené studie naznačují, že S-nitrosované proteiny rozdílné stability zastávají v signálních drahách NO odlišné funkce. Většina S-nitrosothiolů je nestabilní v přítomnosti fyziologické koncentrace glutathionu; míra S-nitrosace těchto proteinů je vyšší při vysokých hladinách NO (Paige et. al., 2008). Signalizace je v tomto případě přímo spojena s průběhem syntézy NO. Malá část proteinů může být S-nitrosována i v přítomnosti velkého množství glutathionu a po inhibici NOS. Takto stabilní S-nitrosované proteiny dále přenáší signál NO; k ukončení signalizace jsou potřeba specifické denitrosační dráhy (Paige et. al., 2008).

Specifita S-nitrosace může být regulována několika faktory; citlivější by vůči ní mohly být proteiny bohaté na cystein. Důležitý se ukázal být prostorový původ zdrojů NO a jeho cíle v buňce (Mannick et. al., 2001). Předpokládá se, že NO náhodně difunduje z místa své syntézy až do okamžiku, kdy se zúčastní chemické reakce. Současné poznatky ale ukazují, že NO je často směřován k příslušným thiolům v proteinu pomocí protein-protein interakce.

1. Přehled metod analýzy S-nitrosothiolů

Pro stanovení S-nitrosothiolů může být použita řada metod využívajících rozdílných technik: např. chemiluminiscenci, spektrofotometrii, fluorimetrii, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), hmotnostní spektrometrii (MS), imunochemické a další metody. Vhodnou volbou metody lze jak sledovat celkové množství S-nitrosothiolů, tak rozlišit mezi S-nitrosovanými proteiny a nízkomolekulárními S-nitrosovanými látkami (Giustarini et. al., 2007).

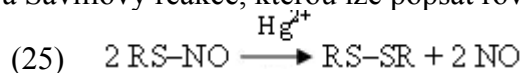
1.1. Štěpení vazby S–NO

Většina metod pro stanovení S-nitrosothiolů zahrnuje přeměnu S-nitrososkupiny na dusitan, případně její redukci na NO. Mezi nejrozšířenější postupy pro uvolnění NO z S-nitrosothiolů patří fotolýza a chemická redukce. Výběr vhodné metody vedoucí k uvolnění NO z S-nitrosothiolů je velice důležitý, protože možné mechanismy se od sebe významně odlišují redukčními vlastnostmi, což má vliv na účinnost i specifitu zvolené metody.

Bylo pozorováno, že fotolýza není specifická pro štěpení vazby S–NO, ale může S-nitrososkupinu uvolnit také z nitrosaminů a dinitrosyl-železnatých komplexů, a to může

vést k nadhodnoceným výsledkům (Alpert et. al., 1997). Fotolýza může způsobit také redukcí dusičnanů na NO v přítomnosti thiolů (Dejam et. al., 2003). Těmto problémům je možné se vyhnout, alespoň částečně, chemickou redukcí. Pro chemickou redukcí se obvykle využívá trijodidové metody a činidla Cu^+ /cystein (Cu^+ /Cys).

Trijodidová metoda spočívá ve štěpení vazby S–NO pomocí I_2/I^- (Hilliquin et. al., 1997). Jodovodík (HI), který vzniká následkem použití I^- v kyselém prostředí, je schopen redukovat dusitany a poskytuje tak nespecifikované množství NO. Proto jsou vzorky předběžně upraveny acidifikovaným sulfanilamidem, který reakcí s dusitanem vytváří diazoniový ion, jenž není jodovodíkem redukován na NO (Marley et. al., 2000). To zvyšuje selektivitu této procedury. Jiný způsob rozlišení S-nitrosothiolů od nitrosylových komplexů využívá Savillovy reakce, kterou lze popsat rovnicí (25):



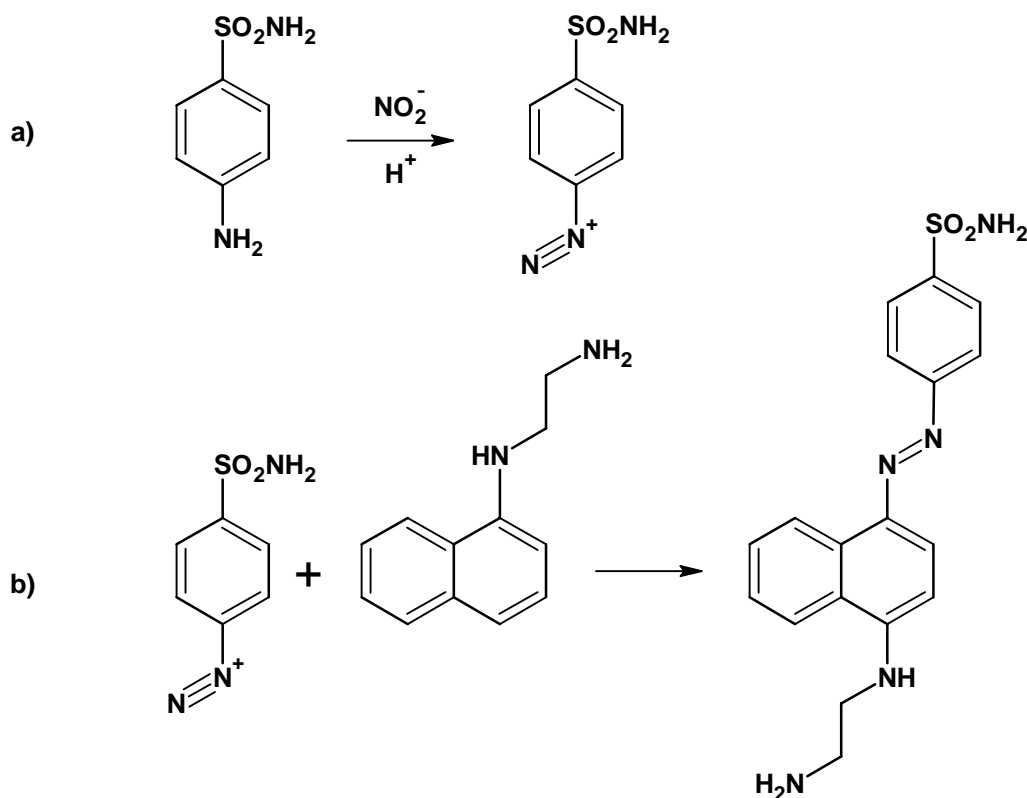
Množství S-nitrosothiolů je pak stanoveno jako rozdíl signálu vzorků, ke kterým byl, resp. nebyl přidán HgCl_2 (Yang et. al., 2003).

Štěpení vazby S–NO činidlem Cu^+ /Cys probíhá při neutrálním pH, a tím je zajištěno, že dusitany, dusičnany ani jiné oxidy dusíku nejsou detekovány (Fang et. al., 1998). Cystein transnitrosylací převede všechny S-nitrosothioly na S-nitrosocystein (Cys-SNO); následně je NO^+ měďným iontem redukován za vzniku NO a Cu^{2+} , Cu^+ je regenerován redukcí cysteinem.

1.2. Spektrofotometrická stanovení

Kolorimetrické metody pro stanovení S-nitrosothiolů v biologických vzorcích nejsou příliš vhodné, protože jejich limit detekce – přibližně 500 nm – je blízký fyziologickým koncentracím.

Nejjednodušší metodou ke stanovení S-nitrosothiolů je modifikace Griessovy metody: v prvním kroku reakce dusitanu se sulfanilamidem (SULF) v prostředí o $\text{pH} < 3$ poskytuje diazoniový kation; ten v dalším kroku reaguje s N-(1-naftyl)ethylendiaminem (NED) za vzniku diazosloučeniny (Obr. 5), která vykazuje silnou absorpenci při 540 nm.

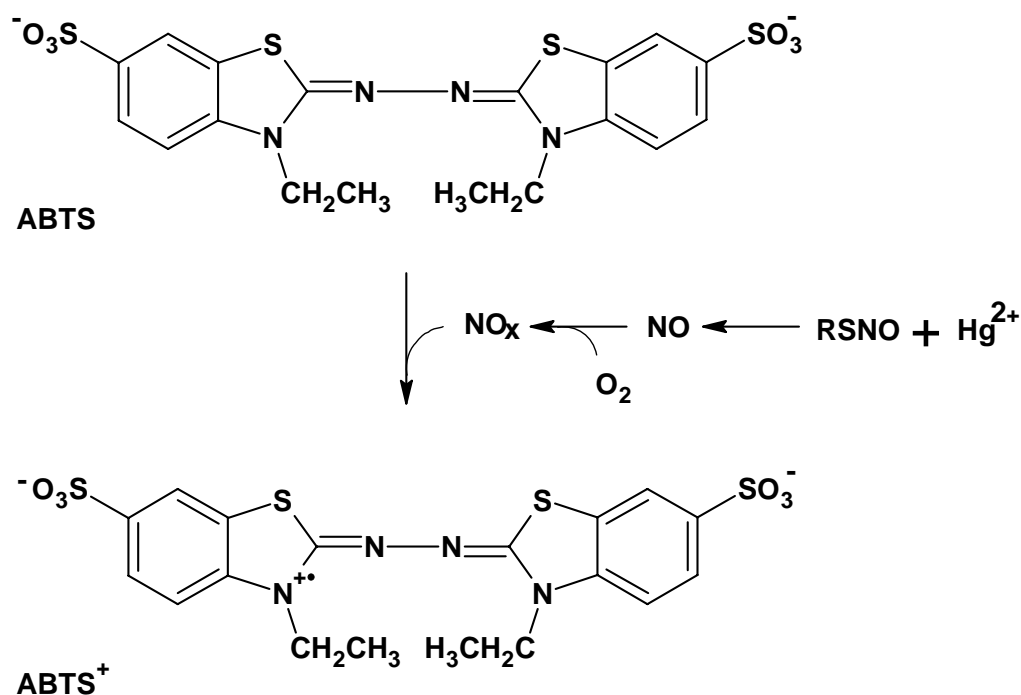


Obr. 5 Griessova reakce: a) dusitany v kyselém prostředí reagují s diazotačním činidlem, sulfanilamidem, za vzniku diazoniového kationu; b) diazoniový kation v dalším kroku reaguje s kopulačním činidlem, NED, za vzniku stabilní azosloučeniny.

Protože je tato metoda založena na detekci dusitanu, jehož koncentrace v biologických tekutinách je mnohem vyšší než je hladina S-nitrosothiolů, před analýzou S-nitrosothiolů je nutné odstranit dříve přítomné dusitany (Marley et. al., 2000) – toho lze docílit např. ultracentrifugací, gelovou filtrací nebo redukcí dusitanů na N_2 sulfamátem. Každý z postupů pro odstranění dusitanů vykazuje určité nedostatky. Materiály, které se používají pro ultracentrifugaci, mohou uvolňovat metabolity interferující s měřením. Odstranění dusitanů sulfamátem musí probíhat v kyselém prostředí, dochází k protonizaci dusitanu na kyselinu dusitou, která je silným nitrosylačním činidlem (Marley et. al., 2000). Přítomnost sulfamátu může způsobit příliš nízký odhad hladiny S-nitrosothiolů, neboť může odstranit i dusitany vznikající štěpením S-nitrosothiolů, třebaže reakce dusitanu se sulfamátem probíhá pomaleji ve srovnání s reakcí dusitanu se sulfanilamidem (Tsikas et. al., 2001). Naopak přítomnost kadmia, které lze použít pro usnadnění štěpení S-nitrosothiolů, může poskytnout nadhodnocené výsledky, protože je schopno redukovat dusičnany na dusitany, čímž umožní jejich detekci (Giustarini et. al., 2007).

Detekční limit této metody se pohybuje v blízkosti $0,2 \mu\text{M}$ dusitanů (Rossi et. al., 2001; Giustarini et. al., 2004). To představuje hlavní překážku, která nedovoluje využití metody pro stanovení S-nitrosothiolů v biologických vzorcích. Hladina S-nitrosothiolů např. v lidské plasmě či krvi je menší než $0,2 \mu\text{M}$ (Rossi et. al., 2001).

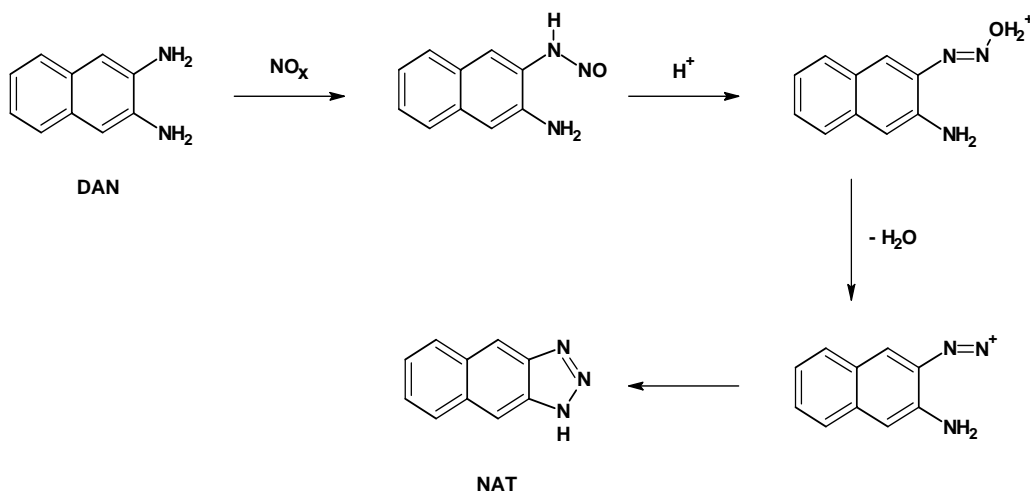
Jiný možný způsob stanovení S-nitrosothiolů spočívá v detekci NO kyselinou 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonovou (ABTS). Oxid dusnatý přemění v přítomnosti kyslíku ABTS na ABTS^+ (Obr. 6), a to má za následek zvýšení absorbance v rozmezí 400 až 800 nm (Cook et. al., 1996).



Obr. 6 Schéma detekce oxidu dusnatého ABTS.

1.3. Fluorimetrická stanovení

Fluorimetrické metody využívají schopnosti NO tvořit N-nitrosylované látky; aromatické diaminy v přítomnosti kyslíku reagují s NO za vzniku triazolů. Stanovení S-nitrosothiolů fluorimetricky vychází z diazotační reakce dusitanu, uvolněného z S-nitrosothiolu, s 2,3-diaminonafthalenem (DAN; Marzinzig et. al., 1997). Přítomné dusitany jsou před vlastní analýzou S-nitrosothiolů odstraněny sulfamátem, následuje inkubace vzorku se směsí DAN a HgCl₂ a poté úprava pH na alkalické hodnoty (11,5 – 12); fluorescence konečného produktu je v alkalickém prostředí výrazně vyšší. Reakcí DAN, který je relativně nefluoreskující, s dusitanem vzniká vysoce fluoreskující sloučenina 2,3-naftotriazol (NAT; Obr. 7), jejíž fluorescence se měří při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 405 nm; detekční limit této metody je 20 nM. Fluorimetrické metody, které využívají této diazotační reakce, lze použít pro stanovení dusitanů, dusičnanů a S-nitrosothiolů.

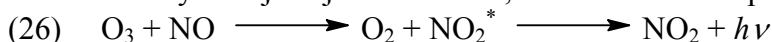


Obr. 7 Mechanismus fluorimetrické detekce: reakcí DAN s N-nitrosylační látkou odvozenou od NO, např. dusitanem, vzniká fluoreskující NAT.

Fluorimetrické metody mohou být ovlivněny stejnými interferencemi, které jsou popsány u stanovení S-nitrosothiolů spektrofotometrickými metodami (viz. kapitola 5.2.); největší problém v tomto případě představuje nízká selektivita metod a omezená reprodukovatelnost experimentů (Giustarini et. al., 2007).

1.4. Chemiluminiscenční stanovení

Chemiluminiscenční metody jsou pro stanovení S-nitrosothiolů nejrozšířenější; jejich použitelnost spočívá především v nízkém limitu detekce. Přístroje detekující chemiluminiscenci využívají stejného základu; mechanismus lze popsat rovnicí (26):



NO reaguje s ozonem za vzniku excitovaného oxidu dusičitého (NO_2^*). Excitované molekuly NO_2^* při návratu do základního stavu uvolní přebytečnou energii emisí světla. Vlnová délka emitovaného světla leží v červené a infračervené oblasti spektra (640 – 3000 nm); intenzita chemiluminiscence je přímo úměrná koncentraci NO.

K reakci dochází v plynné fázi a je nezbytné, aby byly oba reaktanty smíseny ve stejném poměru; nadbytek jednoho z nich způsobuje tlumení luminiscence (Sexton et. al., 1994). Citlivost přístroje pro detekci luminiscence je významně ovlivněna dvěma okolnostmi: úměrným smísením měřeného toku plynu a ozonu a účinností fotonásobiče použitého k měření emitovaného světla. Při měření NO a jeho metabolitů v kapalných vzorcích je důležitým faktorem míra, s jakou je NO uvolňován do plynné fáze – výhodou je jeho nízká rozpustnost (přibližně 2 mM při 20°C), a jak suchý může být udržován plynný proud. Pro uvolnění NO z S-nitrosothiolů se v chemiluminiscenční analýze nejčastěji využívá trijodidové metody (Hilliquin et. al., 1997). Možností, jak rozštěpit vazbu S–NO, aby se uvolnil NO, existuje několik, ve všech případech je nezbytná přítomnost proudu inertního plynu, který uvolněný NO odvede do chemiluminiscenčního analyzátoru (Gow et. al., 2007; Giustarini et. al., 2007).

1.5. HPLC-MS

Pro detekci S-nitrosothiolů HPLC se často využívá mobilní fáze kyselého pH; v takovém prostředí a v přítomnosti thiolů a dusitanů dochází k rychlé a značné tvorbě S-nitrosothiolů. Při analýze S-nitrosothiolů v biologických vzorcích, která probíhá v kyselém prostředí, se tvorbě S-nitrosothiolů předchází obvykle redukcí dusitanů na N_2 sulfamátem amonným (Kluge et. al., 1997). Protože tato reakce probíhá v kyselém prostředí, umělý vznik S-nitrosothiolů nemůže být vyloučen.

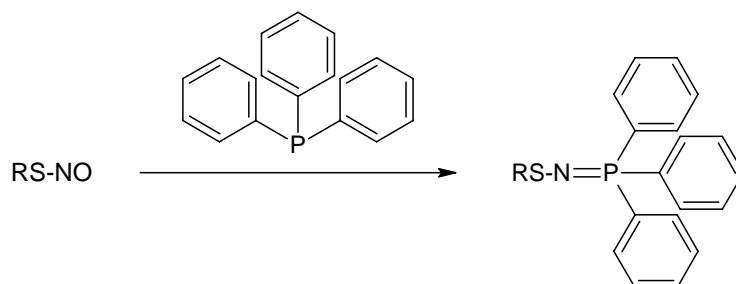
Aby se předešlo možným interferencím v důsledku kyselého pH, byla pro stanovení S-nitrosoglutathionu popsána metoda iontově-párové HPLC s využitím tetrabutylamoniumhydrogensulfátu, která umožňuje analýzu S-nitrosothiolů při neutrálním či mírně alkalickém pH i v přítomnosti velkého množství glutathionu a dusitanů (Tsikas et. al., 2001); v prostředí o tomto pH nedochází k reakci glutathionu s dusitany za vzniku S-nitrosoglutathionu.

Touto metodou se zároveň prokázalo, že odstranění dusitanů sulfamátem není kompletní navzdory jeho aplikaci ve vysoké koncentraci (Tsikas et. al., 2001). Tím se zdůraznila potřeba neutrálního pH pro analýzu S-nitrosothiolů.

2. Přehled metod analýzy S-nitrosylovaných proteinů

Detekce konkrétních S-nitrosylovaných proteinů se zakládá na nepřímých metodách, protože S-nitrososkupinu není možné označit radioaktivně a pro přímou detekci neexistují spolehlivé protilátky (Kettenhofen et. al., 2008). V současné době v používaných metodách dochází k nahrazení –NO skupiny značkou, která je dalším postupem detekována (Jaffrey et. al., 2001; Han et. al., 2008).

V nedávné době byla popsána redukční ligace probíhající cíleně na S–NO skupině (Obr. 8; Wang & Xian, 2008). Reakce S-nitrosothiolu s trifenylofosfinem dává vznik azaylidu, který může být následně izolován.

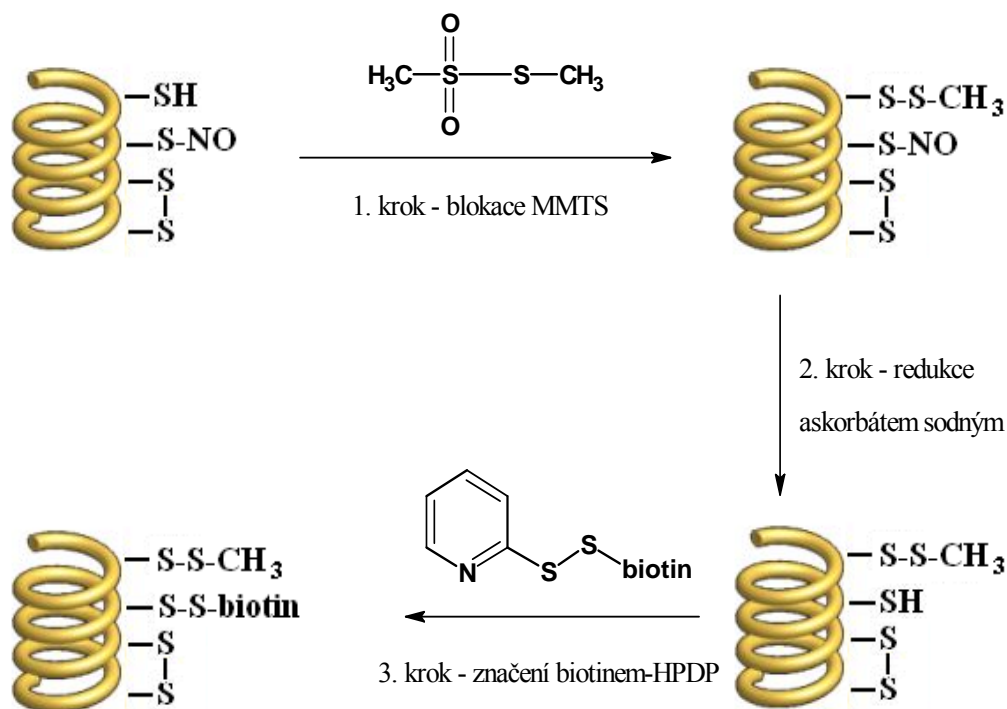


Obr. 8 Schéma tvorby azaylidu z S-nitrosothiolu a trifenylofosfinu (upraveno podle Wang & Xian, 2008).

Jedná se zřejmě o první metodu, která umožňuje přeměnu S–NO skupin na stabilní produkt v jednom kroku. Předpokládá se, že s využitím této reakce může být navržena nová metoda pro detekci S-nitrosothiolů v biologických systémech.

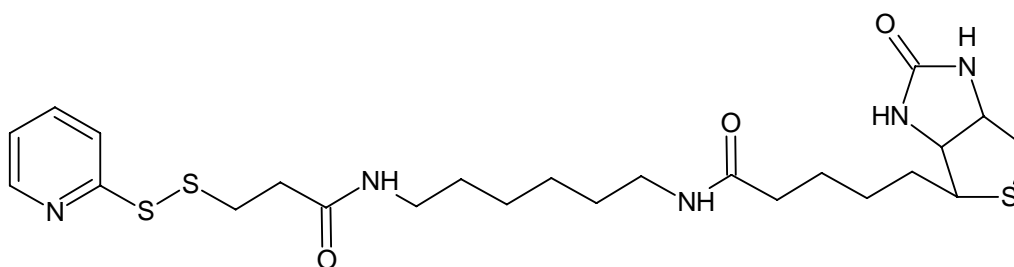
2.1. Biotin-switch metoda

Pro detekci S-nitrosylovaných proteinů lze využít specifického označení S-nitrosylovaného cysteinu biotinem (Jaffrey et. al., 2001). Převod S-nitrosylovaných cysteinů na biotinylované cysteiny se děje ve třech krocích (Obr. 9; Jaffrey et. al., 2001). Proteiny označené biotinem je možno detekovat imunoblottingem a purifikovat afinitní chromatografií s avidinem.



Obr. 9 Schéma modifikace S-nitrosylovaných proteinů Biotin-switch metodou (upraveno podle Jaffrey et. al., 2001).

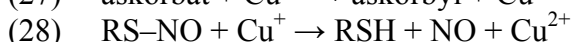
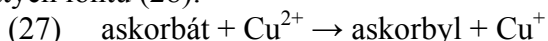
V prvním kroku je nutno zablokovat volné –SH skupiny proteinu, resp. směsi proteinů, methylmethanthiosulfonátem (MMTS), činidlem specifickým pro thiooly. Tomu předchází rozbalení struktury proteinu dodecylsíránem sodným (SDS), aby měl MMTS zajištěn přístup i ke skrytým –SH skupinám. Nadbytek MMTS se odstraní odsolením vzorku na kolonce nebo srážením acetonem, aby při dalším postupu nedocházelo ke kompetici o volné –SH skupiny. Následuje redukce vazeb S–NO askorbátem za vzniku –SH skupiny (Singh et. al., 1996). Nově vytvořené thiooly v posledním kroku reagují s N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamidem (biotin-HPDP; Obr. 10), a tak dojde k specifickému označení cysteinových residuí, která byla původně S-nitrosylována.



Obr. 10 Biotin-HPDP

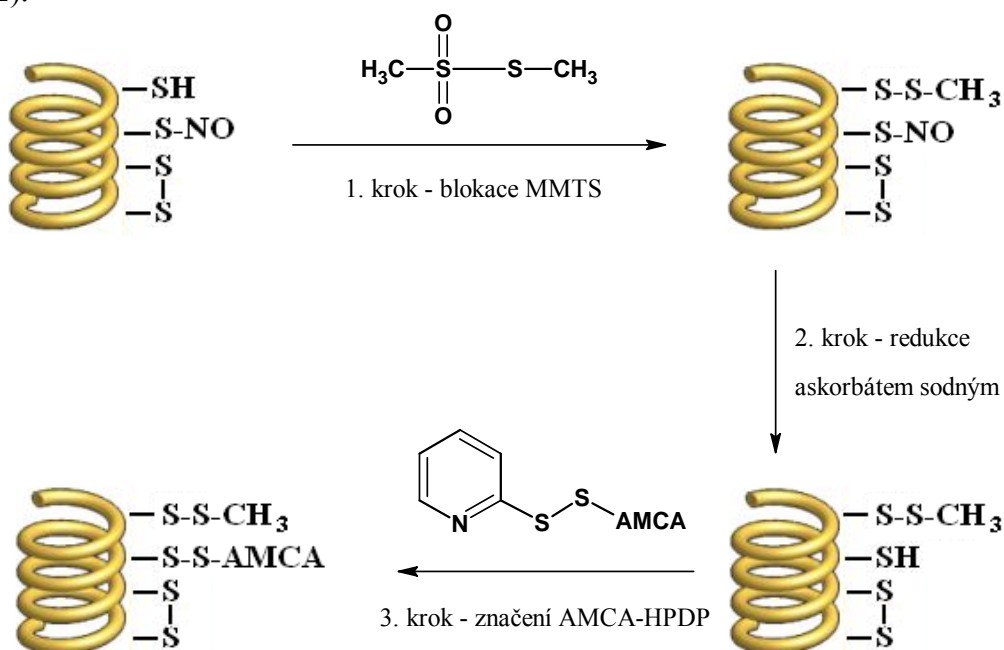
Blokace volných –SH skupin proteinu může být nekompletní, a tak se mohou objevit falešně pozitivní výsledky. Kinetika redukce S-nitrosothiolů askorbátem je pomalá, navíc může dojít i k redukci disulfidových můstků (Kettenhofen et. al., 2008). Askorbát sodný je sám o sobě velice slabým redukčním činidlem S-nitrosothiolů, aby došlo k řádnému označení proteinu biotinem, je zapotřebí užít výrazně větší množství askorbátu, než je v původně popisované metodě. Dále bylo zjištěno, že redukce askorbátem je vyšší v přítomnosti kovových iontů, např. mědi (Wang et. al., 2008). Role askorbátu potom spočívá v redukci

měďnatých iontů na měďné (27), které pak redukují S-nitrosothioly za vzniku thiolu, NO a měďnatých iontů (28):



2.2. AMCA-switch metoda

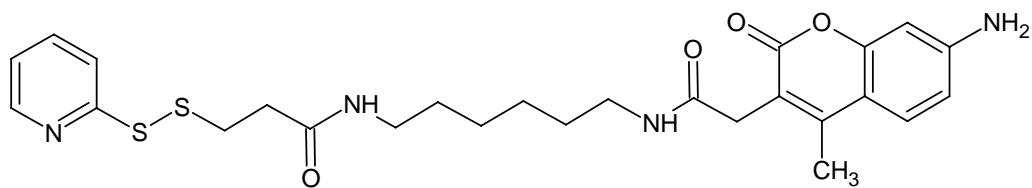
AMCA-switch metoda (Han et. al., 2008) v sobě zahrnuje shodné kroky jako biotin-switch metoda (Obr. 11): blokace volných –SH skupin proteinu, redukce vazeb S–NO askorbátem a označení nově vytvořených –SH skupin. Thioly vytvořené po redukcí askorbátem se, na rozdíl od biotin-switch metody, značí fluorescenčně N-[6,7-(amino-4-methylcumarin-3-acetamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamidem (AMCA-HPDP; Obr. 12).



Obr. 11 Schéma modifikace S-nitrosylovaných proteinů AMCA-switch metodou (upraveno podle Han et. al., 2008).

Nejvýhodnější poměr S-nitrosothiolů ku AMCA-HPDP byl stanoven jako 1:2. S-Nitrosylované proteiny jsou vizualizovány vystavením UV záření, po kterém AMCA emituje vlnové délky 440 – 460 nm. Ve srovnání s metodou využívající značení biotinem je metoda AMCA-switch rychlejší, protože neobsahuje krok detekce imunoblottingem a proteiny mohou být vizualizovány přímo v gelu po elektroforese, a předchází interferencím ze strany endogenně biotinylovaných proteinů, např. pyruvátkarboxylasy (EC 6.4.1.1). Neřeší však možné problémy spojené s nedostatečnou blokací volných –SH skupin a s redukcí askorbátem, jak je popsáno v kapitole 6.1.

AMCA-switch metoda ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím kapalinové chromatografie (LC-MS/MS) umožňuje určení přesné pozice modifikovaného S-nitrosocysteinu. Proteiny jsou rozděleny neredukující SDS-PAGE elektroforesou, jednotlivé bandy se z gelu vyříznou a proteiny v nich obsažené jsou štěpeny trypsinem. Značení AMCA-HPDP je možné využít i pro sledování S-nitrosylovaných proteinů *in situ* (Han et. al., 2008)

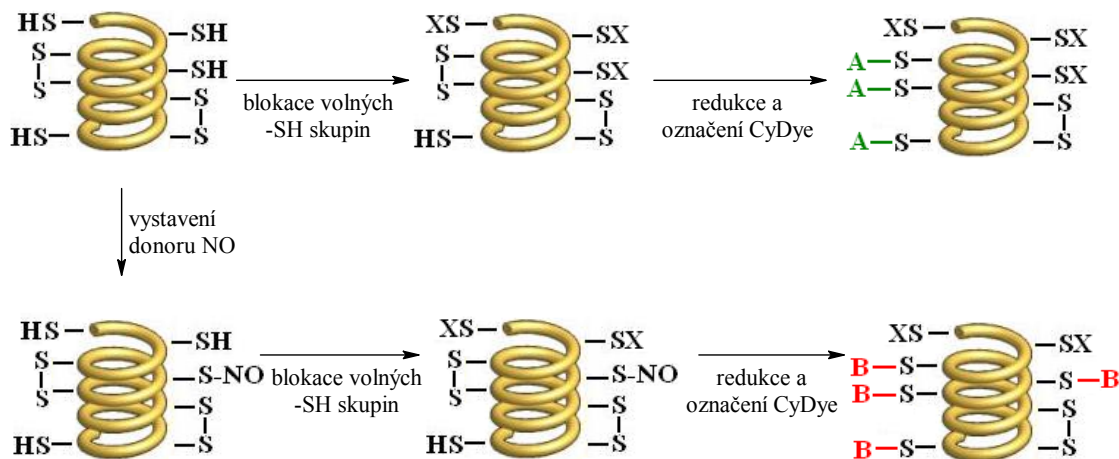


Obr. 12 AMCA-HPDP

2.3. CyDye-switch metoda

CyDye-switch metoda (Kettenhofen et. al., 2008) vznikla modifikací biotin-switch metody; umožňuje určit rozdíl v modifikaci proteinu vystaveného resp. nevystaveného donorům NO (Obr. 13). Jako značek se využívá fluorescenčních cyaninových barviv (CyDye) aktivovaných maleimidem. Tato barviva tvoří s thiolovými skupinami proteinů při pH 7 sloučeniny, které nejsou redukovány redukčními činidly běžně používanými při elektroforesách.

Při CyDye-switch metodě je experimentální vzorek vystaven donoru NO a od této fáze prochází spolu s kontrolním vzorkem stejným procesem s rozdílem v použití jiné fluorescenční značky. V prvním kroku postupu dochází k zablokování volných –SH skupin N-ethylmaleimidem (NEM); ty, které blokaci uniknou, budou v posledním kroku u experimentálního i kontrolního vzorku označeny. Následuje redukce S-nitrososkupin na –SH skupiny pomocí askorbátu a síranu měďnatého; dojde-li k redukci i jiných –NO skupin na –SH, budou v posledním kroku také označeny. Poslední částí postupu je navázání fluorescenčních značek na –SH skupiny nově vytvořené v předchozím kroku; kontrolní a experimentální vzorky jsou označeny jiným CyDye.



Obr. 13 Schéma stanovení S-nitrosylovaných proteinů CyDye-switch metodou. Zablokované –SH skupiny jsou v nákrese označeny jako –SX; kontrolní a experimentální vzorky jsou označeny rozdílnými CyDye, v nákrese označeno písmeny A, B (upraveno podle Kettenhofen et. al., 2008).

Kontrolní a experimentální vzorky jsou po označení CyDye smísены tak, aby ve výsledné směsi byly proteiny z obou ze vzorků přítomny v poměru 1:1. Proteiny se elektroforeticky rozdělí a mohou být vizualizovány přímo v gelu; gel je snímán dvakrát, vyhodnotí se fluorescence odpovídající prvnímu a druhému CyDye. Rozdíl fluorescenčních signálů odpovídá modifikacím vyvolaným donorem NO (Kettenhofen et. al., 2008).

CyDye-switch metodu lze využít v proteomických studiích ve spojení s dvoudimenzionální elektroforesou (2D-elektroforesou). Detergenty s SDS, které se používají během postupu značení CyDye, musí být nahrazeny pufrý, které nijak neinterferují s isoelektrickou fokusací, jenž je součástí 2D-elektroforesy.

Santhanam et. al. publikovali analogický postup detekce S-nitrosylovaných proteinů označením CyDye s názvem metody S-FLOS.. K blokaci volných –SH skupin použili MMTS; redukci provedli askorbátem (Santhanam et., al., 2008).

2.4. Imunochemické metody

S-Nitrosylované proteiny je možné detekovat imunochemickými metodami, které využívají protilátky proti S-nitrosocysteinu. Byly izolovány monoklonální i polyklonální protilátky; anti-S-nitrosocystein s redukováným cysteinem nereaguje (Gow et. al., 2002).

2.4.1. Detekce na Western blotu

Detekce S-nitrosylovaných proteinů na Western blotu může následovat po jejich označení biotinem; dají se přímo použít také protilátky proti S-nitrosocysteinu. Proteiny jsou rozděleny SDS-PAGE elektroforesou a přebírány na nitrocelulózovou membránu. Membrány jsou inkubovány s protilátkou proti S-nitrosocysteinu a S-nitrosylované proteiny jsou vizualizovány s využitím sekundární protilátky značené peroxidásou.

2.4.2. Imunohistochemie

Protilátky proti S-nitrosocysteinu lze použít pro imunohistochemickou detekci S-nitrosylovaných proteinů (Gow et. al., 2002). Jejich použití se nijak zásadně neliší od používání jiných protilátek při imunohistochemických detekcích, je však nezbytná pozitivní a negativní kontrola. Pro pozitivní kontrolu se používá chemická S-nitrosace přídavkem dusitanu v 0,4 M HCl. U negativní kontroly jsou S–NO vazby štěpeny HgCl₂. To nebývá vždy zcela účinné, proto je doporučeno použít organické sloučeniny rtuti.

2.5. Hmotnostní spektrometrie

Metody spojené s hmotnostní spektrometrií (MS) jsou pro analýzu S-nitrosothiolů podstatné především díky jejich selektivitě a přesnosti. K analyzování biologických vzorků se využívá hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC-MS), plynovou chromatografií (GC-MS) a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS). Každý z těchto přístupů v sobě skrývá určité limity. U GC-MS představuje komplikaci tepelná labilita S–NO skupiny a s tím spojená nestálost S-nitrosothiolů. Využití LC-MS je znesnadněno přítomností směsi proteinů při analýze biologických vzorků (Giustarini et. al., 2007).

2.5.1. ESI-MS

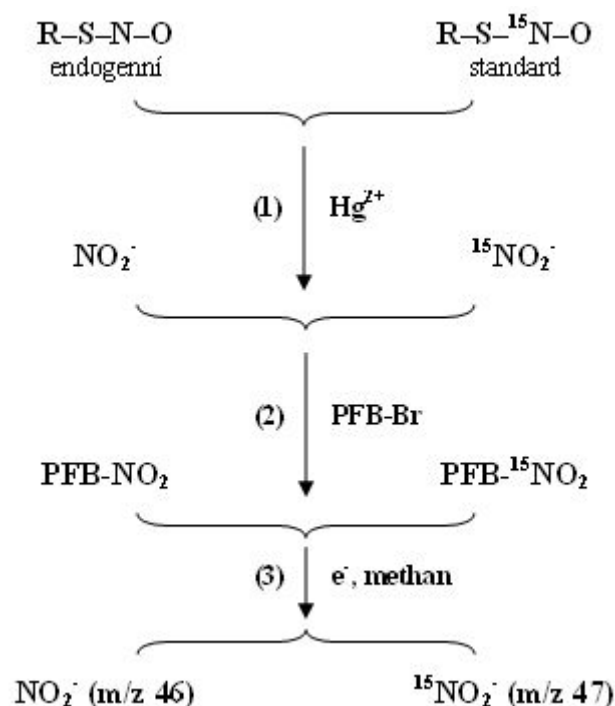
ESI-MS je možné využít pro identifikaci a kvantifikaci modifikací proteinů, které jsou způsobené jejich vystavením NO (Mirza et. al., 1995). Labilita vazby RS–NO vyžaduje při experimentech použití mírných podmínek. ESI-MS se prokázalo, že molekulová hmotnost peptidu/proteinu obsahujícího jedno cysteinové residuum po modifikaci NO se liší od molekulové hmotnosti výchozího peptidu/proteinu o 29 Da. To odpovídá navázání skupiny –NO (30 Da) za současné substituce vodíkového atomu (1 Da). Na hormonu somatostatinu, který obsahuje dvě cysteinová residua, se ukázalo, že tvorba S-nitrosothiolů závisí na koncentraci nitrosylačního činidla; tuto závislost lze sledovat pomocí ESI-MS. ESI-MS umožňuje analýzu velmi malého množství biologického vzorku (Mirza et. al., 1995).

2.5.2. LC-MS

LC-MS metody mohou detekovat S-nitrosothioly bez jejich derivatizace, nicméně některé jsou omezeny na detekci nízkomolekulárních S-nitrosothiolů, např. S-nitrosoglutathionu, takže nenachází široké uplatnění v analýze S-nitrosothiolů v biologických vzorcích (Giustarini et. al., 2007).

2.5.3. GC-MS

GC-MS metoda pro detekci S-nitrosothiolů (Obr. 14) byla popsána pro analýzu S-nitrosylovaného albuminu, který představuje nejpočetnější formu transportu NO u lidí. S-Nitrosokupina S-nitrosothiolů je převedena na dusitan štěpením HgCl_2 (Tsikas et. al., 1999) nebo je využitím činidla Cu^+/Cys převedena na cystein za vzniku S-nitrosocysteinu, ze kterého následně Cu^+ odštěpí NO za vzniku dusitanu (Tsikas et. al., 2002); uvolněné dusitany jsou derivatizovány pentafluorobenzylbromidem (PFB-Br), substituční reakce dává vznik nitro-PFB, který může být analyzován GC-MS. Jako standard bývá používán S- ^{15}N]nitrosoalbumin, který prochází celým analytickým procesem stejně jako vzorek.



Obr. 14 Schéma stanovení S-nitrosoalbuminu (ve schématu označen R-S-N-O) GC-MS analýzou: (1) S-nitrososkupina je štěpena rtuťnatými ionty; (2) uvolněné dusitany jsou derivatizovány PFB-Br; (3) PFB-NO₂/PFB-¹⁵NO₂ jsou separovány GC, ionizovány na NO₂⁻/¹⁵NO₂⁻ a MS rozděleny podle poměru m/z (upraveno podle Tsikas et. al., 2002).

3. Stanovení nízkomolekulární S-nitrosothiolů Savillovou metodou

Princip metody: Metoda je založena na uvolnění NO⁺ z S-nitrosothiolů za katalýzy rtuťnatými solemi, vzniklý dusitan je detekován tvorbou diazoniové soli v kys.prostředí a následnou kopulací s N-(1-naftyletylen)diaminem za tvorby azobarviva. Detekční limit metody je cca 500nM S-nitrosothiolů, lineární kalibrace metody je obvykle v oblasti cca 10-100μM NO₂

Upozornění: *odpad obsahující rtuť je nutno likvidovat jako nebezpečný odpad do příslušné nádoby!*

Zásobní chemikálie :

Činidlo A 3,5 % sulfanilamid v 0,5M HCl

Činidlo B 3,5 % sulfanilamid v 0,5M HC + 1 % HgCl₂

činidlo NED 0,1% N-(1-naftyletylen)diamin - v deion. H₂O – rozpustit, zfiltrvat (roztoky Griess A a Griess B jsou stálé cca měsíce ve tmě při 4°C)

Standardy NaNO₂:

- čerstvé sady standardů v eppendorfkách o koncentraci 10-500 μM se připravují z čerstvě připraveného zásobního 1mM roztoku

Standard SNG

- komerční SNG připravený těsně před použitím v koncentraci 0,1 – 0,5 – 1 – 5 – 10 μM v 0,5M HCl + srovnat s naším preparátem Šírová a spol.

Deproteinizace vzorku:

- *filtrace Centricon*

Postup:

A) Měření v kyvetě:

- pipetovat 50 µl standardu nebo vzorku (blank = pufr pro vzorky nebo 0,5M HCl pro standard)
- přidat 1950µl činidla A nebo B
- inkubovat 5min při lab. teplotě
- přidat 1ml činidla NED
- inkubovat 5min při lab. teplotě
- změřit Abs při 540nm oproti blanku

B) Měření na destičkách v readru:

- pipetovat 5 µl standardu nebo vzorku (blank = pufr pro vzorky nebo 0,5M HCl pro standard)
- přidat 195µl činidla A nebo B
- inkubovat 5min při lab. teplotě
- přidat 100µl činidla NED
- inkubovat 5min při lab. teplotě
- změřit Abs při 540nm oproti blanku

Literatura:

Moore KP and Mani AR (2002), Meth Enzymol 359, 256-268, upraveno podle Gow 2007, J Chromat B 851, 140-151)

LITERATURA

- Angelini R., Manes F., Federico R. (1990) Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.
- Angelini R., Federico R., Bonfante P. (1995) Maize polyamineoxidase: antibody production and ultrastructural localization. *J. Plant Physiol.* **145**, 686-692.
- Atanassova L., Pissarska M., Stoyanov I. (1996) Cytokinins and growth responses of maize and pea plants to salt stress. *Bulg. J. Plant Physiol.* **22**, 22-31.
- Atanassova L., Stojanov I., Pissarska M., Valkova Ch. (1997) Salt stress-induced changes of cytokinins in maize and pea plants RNA. *Bulg. J. Plant Physiol.* **23**, 33-39.
- Barsby T. L., Yarrows S. A., Shepard J. F. (1986) A rapid and efficient alternative procedure for the regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* **5**, 101-103.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2001) Nitric oxide: a nontraditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* **6**, 508-509.
- Bennett P. V., Hada M., Hidema J., Lepre A. M., Pope L. C., Quate F. E., Sullivan J. H., Takayanagi S., Sutherland J. C., Sutherland B. M. (2001) Isolation of high molecular length DNA: Alfalfa, pea, rice, sorghum, soybean and spinach. *Crop Sci.* **41**, 167-172.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* **91**, 179-194.
- Bohnert H. J., Sheveleva E. (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 267-274.
- Bolwell G. P., Butt V. S., Davies D. R., Zimmerlin A. (1995) The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Res.* **23**, 517-532.
- Bolwell G.P., Davies D. R., Gerrish Ch., Auh Ch., Murphy T. M. (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean vells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* **116**, 1379-1385.
- Cella R., Carbonera D. (1997) Peroxidases and morphogenesis. *Plant Peroxidase Newsletter* **10**, 24-29.
- Cochrane C. G. (1991) Mechanism of oxidant injury of cells. *Mol. Aspects Med.* **12**, 137-147.
- Crawford N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **57**, 471-478.
- Criquet S., Joner E. J., Leyval C. (2001) 2,7-diaminofluorene is a sensitive substrate for detection and characterization of plant root peroxidase activities. *Plant Sci.* **161**, 1063-1066.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 779-795.
- Davey M. R., Anthony P., Power J. B., Lowe K. C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* **23**, 131-171.
- Debeaujon I., Branchard M. (1992) Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledons and leaf protoplast – derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep.* **12**, 37-40.
- Dedičová B. (1995) Rastlinné protoplasty. *Biologické listy* **60**, 241-257.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783-792.
- Dixon R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.

- Doerge D. R., Divi R. L., Churchwell M. I. (1997) Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem.* **250**, 10-17.
- Dong M. A., Bufford J. L., Oono Y., Church K., Dau M. Q., Michels K., Haughton M., Tallman G. (2007) Heat suppresses activation of an auxin-responsive promoter in cultured guard cell protoplasts of tree tobacco. *Plant Physiol.* **145**, 367-377.
- 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.
- Elnemma E. M. (2004) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by a hydroquinone-aniline system catalyzed by molybdate. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**, 127-129.
- Florence T. M. (1990) Free radicals antioxidants and cancer prevention. *Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf.* **15**, 88-93.
- Fowke L. C., Constabel F. (1985) Plant Protoplasts. 2-25, CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Fowke L. C., Constabel F. (1986) Plant Protoplasts. 2-15, CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Gajdová J., Navrátilová B., Smolná J., Lebeda A. (2007) Factors affecting protoplast isolation and cultivation of *Cucumis* spp. *J. App. Bot. Food Qual.* **81**, 1-6.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151-158.
- Goldstein S., Russo A., Samuni A. (2003) Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO₂, and O₂. *J. Biol. Chem.* **278**, 50949–50955.
- Gómez J. M., Jiménez A., Olmos E., Sevilla F. (2004) Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *J. Exp. Bot.* **55**, 119-130.
- Graf E., Penniston J. T. (1980) Method for determination of hydrogen peroxide, with its application illustrated by glucose assay. *Clin. Chem.* **26**, 658-660.
- Gramss G., Rudeschko O. (1998) Activities of oxidoreductases enzymes in tissue extracts and sterile root exudates of three crop plants, and some properties of the peroxidase components. *New Phytol.* **138**, 401-409.
- Greenberg J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Gupta P. K., Durzan D. J. (1986) Isolation and cell regeneration of protoplasts from sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Rep.* **5**, 346-348.
- Hernández J. A., Olmos E., Corpas F. J., Sevilla F., del Río L. A. (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* **105**, 151-167.
- Hernández J. A., Campillo A., Jiménez A., Alarcón J. J., Sevilla F. (1999) Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* **141**, 241-251.
- Hernández J. A., Jiménez A., Mullineaux P, Sevilla F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* **23**, 853-862.
- Hernández J. A., Ferrer M. A., Jiménez A., Barcelo, A. R., Sevilla F. (2001) Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* **127**, 817-831.
- Hevel J. M., Marletta M. A. (1994) Nitric oxide synthase assays. *Meth. Enzymol.* **233**, 250-258.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 462-468.
- Chandok M. R., Ytterberg A. J., van Wijk K. J., and Klessig D. F. (2003) The patogen inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**, 469–482.

- Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* **95**, 212-222.
- Kašpárek F., Pastorek R., Šindelář Z., Březina F. (2001) Anorganická chemie, 48-50, Olomouc
- Kav N.nv, Srivastava S., Goonewardene L., Blade S. F. (2004) Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Ann. Appl. Biol.* **145**, 217-230.
- 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.
- Klapheck S., Zimmer I., Cosse H. (1990) Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **31**, 1005-1013.
- Klepper L. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos. Environ.* **13**, 537-542.
- Knowles R. G., Moncada S. (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249-258.
- Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., Kawahara S., Kirino Y., Nagoshi H., Hirata Y., Nagano T. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **70**, 2446-2453.
- 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.
- Kolbert Z., Bartha B., Erdei L. (2005) Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biol. Szeged.* **49**, 13-16.
- Kovalenko P. G., Antonjuk V. P., Maliuta S. S. (2004) Secondary metabolites synthesis in transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Potentilla alba* L. as products of radioactive compounds. *Ukr. Bioorg. Acta* **1-2**, 13-22.
- Kováč J. (1995) Explantátové kultury rostlin. Vydavatelství University Palackého v Olomouci, str. 142.
- Křístková E., Lebeda A. (1995) Genetic resources of vegetable crops from the family *Cucurbitaceae*. *Hort. Sci.*, **22**, 123-128.
- Křístková E., Lebeda A., Vinter V., Blahoušek O. (2003) Genetic resources of the genus *Cucumis* and their morphological description. *Hort. Sci.* **30**, 14-42.
- 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.
- Lebeda A., Křístková E. (1993) Genetická variabilita rodu *Cucumis* a její využití ve šlechtění. *Genetika a šlechtění* **29**, 59-66.
- Lebeda, A., Mieslerová, B. (1998) Genové zdroje rodu *Lycopersicon* a jejich využití při šlechtění rajčete na rezistenci (Genetic resources of genus *Lycopersicon* and their exploitation in tomato resistance breeding). *Hort. Sci.* **25**, 53-65.
- Lindberg S., Landberg T., Greger M. (2007) Cadmium uptake and interaction with phytochelatins in wheat protoplasts. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 47-53.
- 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.
- Low P. S., Merida J. R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* **96**, 533-542.

- Lynch J., Polito V. S., Lauchli A. (1989) Salinity stress increases cytoplasmic Ca activity in maize root protoplasts. *Plant Physiol.* **90**, 1271-1274.
- Millington K. R., Maurdev G. (2004) The generation of superoxide and hydrogen peroxide by exposure of fluorescent whitening agents to UVA radiation and its relevance to the rapid photoyellowing of whitened wool. *J Photochem Photobiol A Chem* **165**, 177-185.
- Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A. (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5**, 62-71.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405-409.
- Mittler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.* **11**, 15-19.
- 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.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Nagata T., Takebe I. (1971) Planting of isolated tobacco mesophyll protoplasts on organic medium. *Planta* **99**, 12-20.
- Navrátilová B. (2003) Konstrukce a biologická charakteristika mezirodového somatického hybridu *Armobrassica*. Doktorská disertační práce, 9-14, Olomouc
- Navrátilová B. (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on *Brassicaceae* – a review. *Hort. Sci.* **31**, 140-157.
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J. T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**, 11-35.
- Okçu G., Kaya M. D., Atak M. (2005) Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turk. J. Agric. For.* **29**, 237-242.
- Parys E., Romanowska E., Siedlecka M., Poskuta J. W. (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol. Plant.* **20**, 313-322.
- Petřek J., Vlašínová H., Havel L., Adam V., Babula P., Víteček J., Bartůček K., Potěšil D., Kizek R. (2006) Organozace embryí ve shlucích raných somatických embryí smrku stepilého (*Picea albies* /L./ Karst.). *Sborník MendelNet04Agro.*, 104-109.
- Plumb J. A. (2004) Cell sensitivity assays: The MTT Assay. *Methods Mol. Med.* **88**, 165-169.
- Polle A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione–pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* **126**, 445–462.
- Prasad K. V. S. K., Paradha Saradhi P., Sharmila P. (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ. Exp. Bot.* **42**, 1-10.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol. (1998) Fyziologie rostlin. 89-116, 412-430.
- Radi R., Beckman J. S., Bush K. M., Freeman B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
- Roest S., Gilissen L. J. W. (1989) Plant regeneration from protoplasts: a literature review. *Acta Bot. Neerl.* **38**, 1-23.
- Sánchez E., Soto J. M., García P. C., López-Lefebre L. R., Rivero R. M., Ruiz J. M., Romero L. (2000) Phenolic and oxidative metabolism as bioindicators of nitrogen deficiency in French bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Strike). *Plant Biol.* **2**, 272-277.
- Sánchez-Romero C., García-Gómez M. L., Pliego-Alfaro F., Heredia A. (1993) Peroxidase activities and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*Persea*

- Americana*, M.) leaves at different ontogenetic stages. *J. Plant Growth Regul.* **12**, 95-100.
- Scandalios J. G. ed. (1992) *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Seki M., Iida K., Saito M., Nakayama H., Yoshida S. (2004) Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: Involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *J. Bacteriol.* **186**, 2046-2051.
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258.
- Siegel B. Z. (1993) Plant peroxidases - an organismic perspective. *Plant Growth Regul.* **12**, 303-312.
- Teisseire H., Guy V. (2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci.* **153**, 65-72.
- 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.
- 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.
- Willison J. H. M., Cocking E. C. (1975) Microfibril synthesis at the surface of isolated tobacco mesophyll protoplasts, a freeze-etch study. *Protoplasma* **84**, 147-159.
- 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.
- Zdunek-Zastocka E., Omarov R. T., Koshiha T., Lips H. S. (2004) Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum* L.) during vegetative development and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.* **55**, 1361-1369.
- Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Application in detecting the activity phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal. Biochem.* **253**, 162-168.

Bakalářské práce:

Pavla Vaníčková, Úloha peroxidu vodíku v rostlinách a metody jeho stanovení, 2006

Markéta Ryzí, Metody stanovení aktivity antioxidantních enzymů, 2006

Diplomové práce:

Jakub Hofman, Úloha oxidu dusnatého v obraně rostlin při biotickém a abiotickém stresu, 2007

Markéta Ryzí, Úloha oxidu dusnatého v obranné reakci okurky seté vyvolané přítomností hliníku a kadmia, 2008

Pavla Vaníčková, Úloha oxidu dusnatého při regeneraci buněk okurky seté z protoplastové suspenze, 2008

Kateřina Klimčíková, 2009, Jana Šírová, 2009, Petra Škapová, 2009

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
BAP	benzylaminopurin
cPTIO	2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
CAT	katalasa
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DAF-FM DA	4-amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetát
DCHBS	kyselina 3,5-dichloro-2-hydroxybenzensulfonová
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FAD	flavinadenindinukleotid
FDA	fluorescein diacetát
FMN	flavinadeninmononukleotid
FW	hmotnost čerstvého rostlinného materiálu
H ₂ DCF DA	2,7- dichlorodihydrofluorescein diacetát
H ₄ B	tetrahydrobiopterin
HR	hypersenzitivní reakce
hpi	hodin po inokulaci
hps	hodin po (vystavení) stresu
IBA	indolylmásečná kyselina
L-NAME	NG-nitro-L-argininmethyl ester
LCM1	tekuté kultivační médium 1
metHb/oxyHb	methemoglobin/oxyhemoglobin
MES	2-(N-morfolino)ethanolsulfonová kyselina
MS médium	Murashige a Skoog médium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAA	naftyloctová kyselina
NADPH	redukovaná forma fosfonikotinamidadenindinukleotidu
NED	N-(1-naftylethylen)diaminem
NiNOR	nitrit:NO reduktasa
NO	oxid dusnatý
NOS	NO-synthasa
NR	nitrátreduktasa
PM	plazmatická membrána
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
POX	peroxidasa
PTIO	2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
PVPP	polyvinylpolypyrrolidon
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutasa
UV záření	ultrafialové záření
WT	planý druh („wild-type“)

PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ



Obr. 19 Přístroje. Digitální předvážky (A), analytické váhy (B), elektromagnetická míchačka (C), flow-box (D), pH metr (E), homogenizátor (F), mikrodestičková třpačka (G), chlazená centrifuga (H), mikrodestičkový spektrofotometr (I), světelný a fluorescenční mikroskop Olympus BX50 s digitální kamerou (J), vibrátorem (K), termostatická skříň (L).