

## Úterý 4.11.1997

### **Biochemické přístupy ke studiu rostlinné buňky**

Argalášová, K. <i>et al.</i> .....	Použité metody stanovení Peroxizomicinu A <sub>1</sub>
Balla, J. <i>et al.</i> .....	Extrakce, čištění a stanovení cytokininů
Benková, E. ....	<b>Metódy subcelulárnej frakcionácie a ich využitie pri štúdiu vnútrobunečnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie <math>\beta</math>-glukozidázy Zm-p60.</b>
de Boer, A.H. ....	<b>Patch - clamp as a tool in plant physiology</b>
Burketová, L., Šindelářová, M. ....	Detekce PR-proteinů po jejich elektroforetickém dělení
Čapková, V. ....	<b>Strategie elektroforetického dělení bílkovin</b>
Čeřovská, N., Moravec, T. ....	<b>SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek</b>
Dobrev, P., Kamínek, M. ....	<b>Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism</b>
Faltus, M. ....	Frakcionace bílkovin z vegetativních částí rostlin na základě jejich rozdílné rozpustnosti
Feltl, T. ....	<b>Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán</b>
Grospietch, M. ....	Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla
Kamínek, M., Zažímalová, E. ....	<b>Jak studovat receptory pro rostlinné hormony ?</b>
Klemš, M. <i>et al.</i> .....	Stanovení kyseliny abscisové RIA metodou
Krpeš, V. ....	Metody analýzy fotosyntetických pigmentů v jehlicích smrku ztepilého <i>Picea abies</i> (L.)KARST.
Macháčková, I. ....	<b>Metody stanovení rostlinných hormonů</b>
Pospíšková, M. a Vacková, K. ....	Elektroforetická analýza isoenzymů
Snopek, J. ....	<b>Kapilární elektroforetické metody ve fytochemii a fyziologii rostlin</b>
Sofrová, D. ....	<b>Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy</b>
Šimek, P. ....	<b>Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu.</b>
Šindelářová, M., Šindelář, L. ....	Izolace protoplastů, inokulace fytovirů a jejich imunodetekce
Vaňková, R. <i>et al.</i> .....	<b>Imunoafinitní chromatografie cytokininů</b>
Vojtěchová, M. ....	Měření katalytické aktivity sacharosasyntasy v <i>in vitro</i> pěstovaných mikrohřízkách bramboru

**Přednášky jsou vyznačeny tučným písmem.**

## Použité metódy stanovenia Peroxizomicínu A<sub>1</sub>

Argalášová, K., Lux, A., Bovanová, L., Mikuš, M., Brandšteterová, E., Piňeyro, A. L.

Katedra fyziológie rastlín, Universita Komenského, Mlynská dolina B-2, 136, Bratislava  
tel: (0421) 07/79 66 47, e-mail: argalasova@fns.uniba.sk

Cieľom práce bolo stanoviť a porovnať prítomnosť Peroxizomicínu A<sub>1</sub> v rastlinnom druhu *Karwinskia humboldtiana* (čel. *Rhamnaceae*). Peroxizomicín A<sub>1</sub> (3,3'-dimetyl-3,3',8,8',9,9'-hexahydroxy-3,3',4,4'-tetrahydro-(7,10')-biantracen-1,1'-(2H,2'H)-dion), na základe molekulovej hmotnosti označovaný aj ako T-514 je charakteristický selektívnou *in vitro* toxicitou na živočíšnych tumorálnych bunkách (PIŇEYRO 1994).

Na stanovenie Peroxizomicínu A<sub>1</sub> boli použité dve chemické metódy:

- a) metóda TLC
- b) metóda HPLC

a) V prípade stanovenia Peroxizomicínu A<sub>1</sub> metódou TLC, Peroxizomicín A<sub>1</sub> bol chloroformom (10 ml/g č.h.) extrahovaný z čerstvého, odváženého rastlinného materiálu *Karwinskia humboldtiana* získaného z podmienok *in vivo* a vysušený pod znížený tlakom. Vysušený chloroformový extrakt bol rozpustený v 1 ml chloroformu a nanášaný na TLC platne 8 x 10 cm (SILICA GEL 60F-254 Division of EM Industries 0623 RGTH), ktoré boli vyvíjané v zmesi benzén - acetón (2 : 1). Prítomnosť Peroxizomicínu A<sub>1</sub> na platni bola sledovaná pomocou UV svetla a porovnávaná so štandardom získaným z laboratória Dr. Waksmanovej z Mexika. Silica gel bol zoškrabaný z podložky a niekoľkokrát opakovane extrahovaný v chloroforme, vysušený vo vákuu a rozpustený opäť v 1 ml chloroformu. Čistota získanej frakcie bohatej na Peroxizomicín A<sub>1</sub> bola sledovaná opakovanou kochromatografiou jednotlivých vzoriek so štandardom (Peroxizomicín A<sub>1</sub>). Kvantifikácia Peroxizomicínu A<sub>1</sub> bola uskutočnená spektrofotometricky (spektrofotometer: SPEKOL - K - 20). Zásobný roztok Peroxizomicínu A<sub>1</sub> (680 mg · 10 ml<sup>-1</sup> chloroformu) bol rozriedený na nasledujúce koncentrácie: 0,68; 2,04; 3,4; 6,8; 10,2; 20,4 (mg · ml<sup>-1</sup>) a spektrofotometrom boli zaznamenané hodnoty absorpcie jednotlivých koncentrácií pri vlnovej dĺžke 425 nm. Z nameraných hodnôt absorpcie bola vytvorená kalibračná krivka s typickou lineárnou funkciou:

$$x \text{ [mg]} = \frac{ABS - 0,0038}{0,039}$$

a regresným koeficientom 0,9985.

Frakcie bohaté na Peroxizomicín A<sub>1</sub> izolované pomocou TLC z chloroformových extraktov boli zriedené 5, 25, 125 alebo 725 x a spektrofotometricky boli zmerané hodnoty absorpcie pri vlnovej dĺžke 425 nm.

b) V prípade stanovenia Peroxizomicínu A<sub>1</sub> HPLC metódou, Peroxizomicín A<sub>1</sub> bol etylesterom kyseliny octovej (10 ml/g č.h.) extrahovaný z čerstvého, odváženého rastlinného materiálu *Karwinskia humboldtiana* získaného z podmienok *in vivo* a vysušený pod znížený tlakom. Vysušený extrakt bol rozpustený v 1 ml metanolu a stanovený HPLC metódou na kolóne Waters C<sub>18</sub> (150 x 3,9 mm, 4mm) s mobilnou fázou metanol - tlmivý roztok McIlvaine v pomere 60 : 40 pri pH 4 s prietokom mobilnej fázy 0,7 ml/min za laboratórnej teploty 23°C. Dávkovaný objem bol 20 ml. Detekcia bola určená pri vlnovej dĺžke 269 nm.

Porovnaním oboch použitých metód stanovenia Peroxizomicínu A<sub>1</sub> sa metóda TLC javí finančnejšou, ale pri kvantifikácii uvedenej látky je nutné uprednostniť metódu presnejšiu a účinnejšiu metódu HPLC.

Ďalšia časť výskumu bude zameraná na stanovenie Peroxizomicinu A<sub>1</sub> z raslinných druhov *Karwinskia humboldtiana* a *Karwinskia parvifolia*, ktoré sa z hľadiska percentuálneho podielu a chemickej dostupnosti práve Peroxizomicinu A<sub>1</sub> javia najzaujímavejšie (WAKSMAN a kol. 1990).

Literatúra:

- GUERRERO, M., WAKSMAN, N.: Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). In *Farmacologia Karwinskia humboldtiana* Ingles, 10, 1981-1992 (1996)
- PIÑEYRO, A.L., MARTINEZ DO VILLARREAL, L., GONZALEZ, A. R.: *Toxicol.* 92, 217-227 (1994).
- SALAZAR, M.L., PIÑEYRO, A., WAKSMAN, N.: A reverse phase HPLC method for quantification of Peroxisomicine and other anthracenonic compounds. In *J.Liq.chrom. & rel. technol.*, 19(9), 1391 - 1403 (1996)
- TOUCHSTONE, J.C.: *Practice of thin layer chromatography*. Third Edition, Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, 14-69, 264-290, 1992
- WAKSMAN, N., RAMÍREZ, D.R.: Chemical and toxicological investigation of *K. humboldtiana*. Congress of Natural Products Res., Park City, USA, 1990

## Extrakce, čištění a stanovení cytokininů

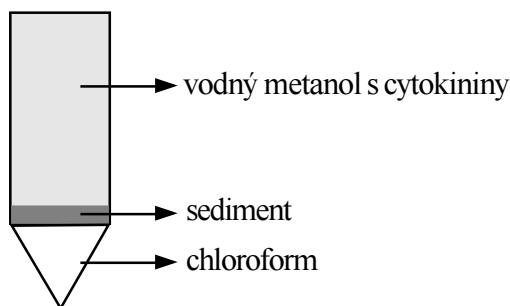
Balla, J., Klemš, M., Blažková, J., Procházka, S.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, AF MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
tel: 05/45 13 30 23, e-mail: maci@dahlia.vszbr.cz

### Abstrakt

Významnou skupinou rostlinných hormonů jsou cytokininy. Cytokininy stimulují dělení buněk a na úrovni integrity rostliny podporují např. větvení. Tvoří velmi početnou skupinu fytohormonů chemicky odvozených od adeninu. Nejčastěji se cytokininy v rostlinách vyskytují jako volné báze, ribosidy, ribotidy a glukosidy a to ve velmi malých množstvích, v ng/g čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu.

Vzhledem k jejich malému množství v pletivech a snadné oxidaci izoprenoidních cytokininů jsou extrahovány organickými rozpouštědly s antioxidantem. Purifikace probíhá v několika krocích. Nejprve jsou odstraněny lipidy a lipofilní barviva (chlorofyl) při centrifugaci homogenátu v Bieleškiho fixáži (metanol : chloroform : kyselina mravenčí : voda = 12 : 5 : 1 : 2). Doplněním extraktu o polovinu objemu vodou dosáhneme při centrifugaci oddělení supernatantu (vodný metanol s kyselinou mravenčí) od chloroformu (chlorofyl, tuky atd.), ve kterém není žádná ztráta cytokininů (zjištěno pomocí radioaktivního standardu).



Vodný metanol je pak odpařen na rotační vakuové odparce do sucha. Pro případnou potřebu štěpení ribotidů kyselou fosfatázou jsou vyfoukány zbytky kyseliny mravenčí v digestoři. Další purifikace probíhá v acetátamonném pufru na kolonách iontoměničů. Na koloně P-celulózy dochází k pozitivní sorpci cytokininů, z této kolony jsou pak eluovány hydroxidem amonným. Na DEAE-celulóze jsou zachyceny nečistoty se záporným nábojem. Poslední krok čištění je chromatografie na reverzní fázi - cytokininy jsou zachyceny na kolonce hydrofobního C18 materiálu (Sep-pak). Eluovány jsou ze C18 kolony metanolem. (MACHÁČKOVÁ et al. 1983).

Po separaci cytokininů pomocí HPLC na báze a ribosidy zeatinu, izopentenyladeninu a benzyladeninu následuje kvantitativní stanovení jednotlivých cytokininů ELISA testem (STRNAD et al. 1992) jehož citlivost je v pmol. Principem ELISA stanovení je kompetice cytokininu z rostlinného extraktu a cytokininu značeného enzymem (alkalická fosfatáza) ve vazbě na specifickou protilátku. Substrátem sloužícím k vlastnímu stanovení fosfatázy je pak *p*-nitrofenylfosfát a absorbance se odečítá při 405 nm na readru Uniscan.

Test se provádí v jamkách mikrotitračních destiček. Postup začíná navázáním protilátek na stěny jamek. Po inkubaci se přebytečné protilátky vymyjí a pipetuje se standardní cytokinin a cytokinin izolovaný z rostlinného extraktu. Po navázání cytokininu se destička opět promyje a přidává se cytokinin konjugovaný s alkalickou fosfatázou. Přidá se konstantní množství substrátu. Po krátkodobé inkubaci (15 - 60 minut) je enzymatická reakce zastavena hydroxidem sodným. Po měření absorbance a sestavení kalibrační křivky se odečítá přesné množství cytokininů ve vzorcích.

Čištění cytokininů začíná přípravou materiálu a homogenizací vzorků první den, další den probíhá vlastní purifikace, následující den separace přečištěných extraktů na HPLC, další den následuje příprava materiálu na ELISA stanovení a poslední den vlastní ELISA.

Ke zjištění ztrát cytokininů během čištění extraktů je vhodné přidat do extraktů radioaktivní standart o známé aktivitě ihned po homogenizaci vzorků. Výtěžek se zjišťuje po posledním odpaření vzorku do sucha (před nástřikem na HPLC).

K nezbytnému laboratornímu vybavení patří centrifuga, rotační vakuová odparka, peristaltická pumpa nebo separátor Dorcus, HPLC, zařízení pro měření radioaktivity, čtečka pro ELISA-test, uvedené chemikálie.

# Metódy subcelulárnej frakcionácie a ich využitie pri štúdiu vnútrobunečnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie $\beta$ -glukozidázy Zm-p60

Benková, E.

Biofyzikálny ústav AVČR, Královopolská 135, Brno  
tel: 05/41517184, fax: 05/41211293, e-mail: benkova@ibp.cz

Metabolické deje, ktoré sa v bunke odohrávajú, majú nielen svoj časový, ale aj priestorový priebeh. Vnútorná štrukturalizácia je pre bunku zároveň určitou kompartmentalizáciou funkcií. Hlavné fyziologické procesy sa odohrávajú v špecializovaných bunečných organelách (s chloroplastami spojená fotosyntéza, respirácia typická pre mitochondrie, proteosyntéza na ribozómoch, genetická knižnica v jadre). Pre takéto funkčné členenie bunky je dôležitá vzájomná komunikácia medzi bunečnými kompartmentami, prenos látok a signálov. Priestorová kompartmentalizácia tak môže byť významným prvkom riadiaceho mechanizmu bunky.

Jedným z metodických prístupov k štúdiu priestorovej kompartmentalizácie látok a metabolických procesov v bunke je subcelulárna frakcionácia; separácia bunečných organel a izolácia čistých, morfolologicky a fyziologicky intaktných štruktúr bez kontaminácie inými bunečnými partikulami. Šetrná a účinná homogenizácia materiálu je predpokladom úspešnej separácie neporušených organel. Výber spôsobu homogenizácie závisí na charaktere východzieho pletiva, vlastnostiach izolovanej bunečnej organely a študijných cieľoch, na ktoré má byť použitá. Mechanické spôsoby homogenizácie materiálu (rozotrením s pieskom v trecej miske, krájaním a mixovaním materiálu, sonikáciou) sú prístupy invazívnejšie, vyžadujúce si väčšie množstvo východzieho materiálu s menším výťažkom. Ich výhoda je však v rýchlosti, s ktorou je možné organely izolovať a vyhnúť sa tak rozsiahlejším metabolickým zmenám, s ktorými je spojená 10-15 hodinová kultivácia pletív v enzymatických roztokoch. Uvoľnenie buniek enzymatickým natrávením a ich následné rozbitie osmotickým šokom je jeden z najšetrnejších prístupov, ktorým možno získať organely s vysokou intaktnosťou a čistotou. V tomto prípade je ale nutné počítať s metabolickými zmenami, ku ktorým dochádza počas dlhodobej kultivácie v tráviacom médiu. Rozbitím buniek sa dostávajú organely do priameho kontaktu s toxickými látkami, ktoré sa uvoľňujú z detoxifikačných oddielov bunky. Homogenizačné médium preto musí obsahovať látky, ktoré ich chránia proti fenolom, chinónom, oxidázam ťažkých kovov a zabraňujú povrchovej denaturácii. Separácia organelárnej frakcie z homogenizovaného materiálu môže byť prevedená - centrifugáciou, elektroforetický, fázovou separáciou, špecifickou adsorpciou. Výber adekvátnej metódy je nutné posudzovať vzhľadom k materiálu a bunečnej partikule, ktorá je izolovaná.

Kritériom čistoty izolovanej subcelulárnej frakcie je aktivita markerových enzýmov viazaná na konkrétny typ bunečnej organely (napr. cytochróm-c-reduktáza pre endoplazmatické retikulum, cytochróm-c-oxidáza pre mitochondrie, kataláza pre mikrozomálne telieska, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza pre chloroplasty, a-mannozydáza pre vakuoly, či fruktózo-6-fosfát fosfotransferáza pre cytoplazmu). Morfologická a fyziologická intaktnosť je hodnotená mikroskopicky, alebo na základe aktivity markerového enzýmu.

Každý nový objekt, ktorý sa stane predmetom subcelulárnej frakcionácie si vyžaduje modifikáciu a optimalizáciu protokolu na izoláciu príslušnej bunečnej organely.

Pre účely štúdia subcelulárnej kompartmentalizácie cytokinínových metabolitov a lokalizácie  $\beta$ -glukozidázy Zm-p60, enzýmu s významným postavením v metabolizme cytokinínov, bol optimalizovaný protokol na izoláciu chloroplastov *Nicotiana tabacum* SR1 z rastlín pestovaných *in vivo* a protokol na izoláciu vakuol *Nicotiana tabacum* SR1 z rastlín pestovaných *in vitro*.

Pre izoláciu chloroplastov bolo listové pletivo homogenizované krájaním a mixovaním vysokootáčkovým homogenizátorom v homogenizačnom puffry obsahujúcom polyvinylpyrolidon, kyselinu

izoaskorbovú, EDTA a bovinný sérum-albumin (BSA), ako hlavné ochranné látky. Chloroplasty boli purifikované centrifugáciou na gradiente Percol. Intaktné chloroplasty sa koncentrovali na medzivrstve 40-80% Percolu. Získaná bola chloroplastová frakcia s 98-99% intaktnosťou, bez kontaminácie cytozolom a mikrozomálnymi telieskami, s menej ako 2% kontamináciou mitochondriami a 4-5% kontamináciou endoplazmatickým retikulom.

Mechanická homogenizácia nie je pre izoláciu vakuol dostatočne šetrná metóda. K získaniu intaktnej vakuolárnej frakcie boli preto najprv izolované protoplasty (podľa modifikovanej metódy Nagy a Maliga, 1976). K uvoľneniu vakuol z protoplastov došlo po tepelno-osmotickom šoku a ich separácia od ostatných bunčných kompartmentov bola prevedená flotovaním. Intaktné vakuoly sa koncentrovali na interfáze 5% roztoku Ficol a 0,6% betaínu (Dombrowski J.E. et al., 1993). Úspešnosť izolácie vakuol z protoplastov mezofylu listov bola hodnotená ako zvýšenie aktivity vakuolárneho markerového enzýmu  $\alpha$ -mannozidázy vo vakuolárnej frakcii oproti jeho aktivite v protoplastoch. Izolovaná vakuolárna frakcia mala 4-5x vyššiu aktivitu  $\alpha$ -mannozidázy v porovnaní s protoplastami.

#### Literatúra:

- Nagy J.I., Maliga P., (1976), *Zpflanzenphysiol* 78: 453-455.  
Dombrowski J.E., Gomez L., Chrispeels M.J., Raikhel N.T., (1993), *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

## **Patch-Clamp as a Tool in Plant Physiology**

de Boer, A.H.

Vrije Universiteit, Faculty of Biology, Department of Genetics, Section Plant Physiology  
De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands  
tel.: (31) 20 4447162, fax: (31) 20 4447155, e-mail: ahdeboer@bio.vu.nl

---

An important function of biological membranes is to create and maintain gradients in ion and solute concentrations. Proteins embedded in the membranes control which ions/solutes are accumulated and which are excluded. These transport proteins can be divided in three categories: 1. Primary pumps (using ATP, redox energy or light as energy source), 2. carriers (transport coupled to the gradient of another ion) and 3. Ion channels (transport driven by electrochemical gradient). Transport is important for many aspects of plant growth and development: cell expansion, mineral nutrition, long distance transport in phloem and xylem, cellular and whole-plant responses to environmental signals and in hormonal signal transduction.

Electrophysiology is the study of transport carrying a net charge across membranes and the proteins that are responsible for that. The patch-clamp technique is the highest-resolution method and since its introduction by Neher and Sakmann in the early 1980s it has been applied successfully to plants.

In this seminar an overview will be given of the transport proteins identified thus far. It will be explained what the patch-clamp technique is and what kind of equipment is necessary to set-up a work station. Then the isolation of cells suitable for patch-clamp measurements and the methods to make a so-called 'giga-seal' will be discussed. After the seal has been formed, the experimenter must decide on which configuration (e.g. whole cell, excised inside-out or outside-out patch) and which computer protocol to use, depending on what the experimenter is interested in. Once the measurements have been made, the data must be interpreted and presented in the right format. Examples of measurements will be given and it will be explained how to 'read' the figures. In the end some 'new' methods which will be indispensable in future patch-clamp studies will be briefly introduced; e.g. expression cloning, heterologous expression and reverse genetics.



## Detekce PR-proteinů po jejich elektroforetickém dělení

Burketová, L., Šindelářová, M.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1a, 160 00 Praha  
tel: 02/24 31 01 09, fax: 02/24 31 01 13, e-mail: elsindel@site.caz.cz

Označení skupiny nově syntetizovaných proteinů v rostlinách infikovaných viry či houbovými patogeny jako PR-proteiny (pathogenesis-related proteins) - proteiny související s patogenezí, bylo na základě pozdějších poznatků rozšířeno též na proteiny indukované dalšími biotickými či abiotickými faktory. Mezi tyto další induktory PR-proteinů patří zejména některé chemické látky (kyselina salicylová, akrylová, 2,6-dichloroisoinikotinová, těžké kovy), mechanické poškození pletiv, osmotický stres, solný stres, stárnutí rostlin atd. Při studiu indukce, vlastností a funkce těchto nově syntetizovaných proteinů byla potvrzena jejich role v indukované rezistenci k následnému patogenu, na které se v případě superinfikujících hub a bakterií podílí glukanasová a chitinasová aktivita některých z nich (skupiny PR-2, PR-3).

Zatímco kyselé PR-proteiny jsou extracelulárně vylučovány, bazické se akumulují ve vakuolách. Kyselé PR-proteiny se většinou analyzují v extracelulární tekutině získané odstředěním po vákuové infiltraci příslušného roztoku. K rozdělení proteinů se používá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za nativních a denaturujících podmínek. Enzymové aktivity jednotlivých bandů jsou detekovány v překrývacím gelu (chitinasy) nebo přímo v PAGE gelu (glukanasy).

### Extrakce extracelulární kapaliny (Parent and Asselin, 1984)

Listové čepele se nastříhají na menší části o velikosti asi 5x6cm nebo se v případě malých lístků ponechají celé. Takto upravené listy ponořené v roztoku: 25mM tris-HCl, pH 7,8 obsahující 0,5M sacharózu; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF); 5mM 2-merkaptoetanol, se vákuově infiltrují, jemně osuší a svinou tak, aby je bylo možno bez poškození vložit do květy nebo upravené injekční stříkačky. Infiltrát získaný následnou centrifugací při 1000g 10 min, 4C se může bezprostředně použít pro analýzu proteinů PAGE nebo uložit při -18C.

- \* Pro centrifugaci vákuově infiltrovaných listů jsou vhodné centrifugační květy o objemu 30- 50 ml s malým množstvím skleněných kuliček nebo jiného inertního materiálu. Srolované listy se vloží na vrstvu kuliček v květi. Jinou možností je použití upravené injekční stříkačky (zkrátit, vyjmout píst, na dno stříkačky vložit sítko) umístěné ústím v mikrokvěti eppendorf ve větší (30-50ml) centrifugační květi.
- \* Při manipulaci s listy je nutné se vyvarovat zbytečného poškození pletiv, jinak se vzorek kontaminuje intercelulárními proteiny.
- \* Někteří autoři používají místo výše uvedeného roztoku pro infiltraci pouze deionizovanou vodu. Vynechání sacharózy umožňuje snadné zakoncentrování vzorku lyofilizací.

### Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Molekulové váhy extracelulárních proteinů jsou stanovovány pomocí PAGE za denaturujících podmínek (SDS) podle obvyklého postupu (.....), spektrum kyselých proteinů v nativních PAGE gelech podle Laemmliho (1970). V obou postupech se používají ploché polyakrylamidové gely: 4% zaostřovací a 7,5-10% rozlišovací.

- \* Před nanášením vzorků je potřeba stanovit obsah proteinů ve vzorcích např. podle Bradfordové (.....) a upravit koncentraci zředěním.

### Barvení gelů

Gely mohou být barveny Coomassie R-250

při slabší koncentraci proteinů je vhodnější obarvit gely stříbrem. V naší laboratoři používáme modifikovaný postup podle Marcinky:

Příslušnost jednotlivých bandů k molekulovým váhám a relativní mobilitu nativních proteinů vyhodnocujeme pomocí elfomodułu videoimagingu Lucia (LIM).

### **Stanovení glukanasové aktivity v gelech**

Izoenzymy b-1,3-glukanas rozkládají substrát laminarin na glukózu a redukující oligomery, které vytvářejí barevnou reakci s triphenylterazoliovým reagens.

PAGE gel po elektroforéze za nativních podmínek se nejprve promývá deionizovanou vodou (3x 5 min, 200ml vody na každé promytí) a ekvilibruje v 0,05 M acetátovém pufru (pH 5,0) (5 min), poté se gel přenesse do roztoku 2% laminarinu ve stejném pufru a inkubuje při 40C 40-60 min. Po skončení inkubace se gel opět opláchne deionizovanou vodou, ustálí v roztoku obsahujícím 25% metanolu a 10% kyseliny octové a znovu krátce opláchne vodou. Bandy s glukanasovou aktivitou se vizualizují v roztoku 1M NaOH obsahujícím 0,1% 2,3,5-triphenylterazolium chloridu v horké vodní lázni (65-70 C) za neustálého pohybování gelem v lázni. V průběhu 10 minut by se měly v místě glukanasové aktivity objevit tmavě červené bandy. Gely se uchovávají v roztoku: 25% metanolu, 10% kyseliny octové a 5% glycerolu nebo je lze obarvit Coomassie R-250 či stříbrem.

- \* Pro vyloučení falešných pozitivit se připraví blank: gel se stejnými vzorky se inkubuje v acetátovém pufru bez substrátu (laminarinu), jinak je postup zcela stejný.
- \* Použitý roztok substrátu laminarinu je možno zmrazit (-18C) a po určitou dobu uchovávat, roztok 2,3,5-triphenylterazolium chloridu je potřeba připravit vždy čerstvý.
- \* Přílišné pozadí je obvykle důsledkem nedostatečného promytí gelu vodou nebo příliš vysokou teplotou vodní lázně při vyvolávání reakce.

### **Stanovení chitinasové aktivity v gelech**

Metoda využívá skutečnosti, že se glykolchitin, který je substrátem chitinas, afinitně váže na Fluorescent brightner 28. V místě bandů s chitinasovou aktivitou je substrát rozložen a k vazbě na Fluorescent brightner 28 (calcofluor) nedochází. Tato místa se na UV transiluminátoru jeví jako tmavé nefluoreskující bandy na fluoreskujícím pozadí.

PAGE gel po nativní elektroforéze se 5min ekvilibruje v 0,1 M (pH 5,0) acetátovém pufru, poté se překryje překrývacím akrylamidovým gelem obsahujícím glykolchitin(.....) a inkubuje ve vlhké komoře 1-2 hodiny při 38 C. Po ukončení inkubace se překrývací gel sejme s rozlišovacího gelu a inkubuje 5 min ve tmě s ...roztokem Fluorescent Brightneru. Dále se gel promývá deionizovanou vodou nejméně 2 hodiny nebo přes noc při 4 C. Bandy jsou viditelné na UV transiluminátoru jako tmavá místa na fluoreskujícím gelu.

- \* V případě blanku se postupuje stejně s tím rozdílem, že se do překrývacího gelu nepřidává glykolchitin.
- \* Je nutné zajistit dokonalý kontakt obou gelů po celé ploše, např. vytlačení případných vzduchových bublin válením skleněné pipety.
- \* Bandy s chitinasovou aktivitou se označí propíchnutím gelu nebo se překreslí na transparentní fólii a porovnájí s rozlišovacím gelem po jeho obarvení.
- \* Někteří autoři doporučují stanovovat glukanasovou aktivitu v rozlišovacím gelu po jeho inkubaci s překrývacím gelem obsahujícím glykolchitin. V naší laboratoři jsme však s tímto postupem neudělali dobrou zkušenost.

### **Potřebné vybavení**

- \* vertikální elektroforéza
- \* kývačka - shaker na barvení gelů
- \* centrifugy

- \* termostat
- \* vákuová pumpa
- \* mrazicí box (-18C)

Literatura:

- Parent, J.G. a Asselin, A. 1984. Detection of pathogenesis-related proteins (PR or *b*) and of other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot.* 62:564- 569.
- Pan, S.Q., Ye, X.S., Kuc, J. 1991. *Phytopathology* 81:970-974.
- Shimoni, M. 1994. A method for activity staining of peroxidase and  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 220: 36-38.

## Strategie elektroforetického dělení bílkovin

Čapková, V.

Ústav experimentální botaniky AVČR, odd. biologie pylu, Ke dvoru 15, Praha 6 166 30  
e-mail: capkova@site.cas.cz

Elektroforetické dělení bílkovin (elfo) patří mezi běžně používané postupy a přesto často získané výsledky zaostávají za možnostmi této metodiky. Před vlastními analýzami se vyplatí vzít v úvahu řadu faktorů, které mohou velmi výrazně ovlivnit konečný výsledek dělení bílkovin.

- 1) možnosti dělení: a) celých funkčních komplexů (Blue PAGE)
  - b) nativních bílkovin (IEF)
  - c) denaturovaných bílkovin (SDS-PAGE)
  - d) kombinací a-c získat komplexní obrázek (2-D-SDS-PAGE)
- 2) možnosti buněčné frakcionace na:
  - a) rozpustné (cytosolické bílkoviny)
  - b) nekovalentně vázané bílkoviny
  - c) bílkoviny buněčných kompartmentů: ER, Golgi, mitochondrií, chloroplastů, buněčné stěny
- 3) možnost modifikovat homogenizace a extrakce, možnost volby osmotické hodnoty, molarity a pH pufru, typu a koncentrace neiontových i iontových detergentů a solí
- 4) možnost identifikovat určité, známé bílkoviny jejichž zviditelnění je možné i na pozadí směsi ostatních bílkovin (enzymatické reakce, imunodetekce)
- 5) identifikovat a charakterizovat bílkoviny, které se objevují jako odraz vývojových nebo indukovaných procesů v rostlinných buňkách.

### Jaké otázky je možno řešit pomocí elfo:

- 1) ukázat změnu bílkovinného spektra jako funkční odpověď buňky
- 2) ukázat syntézu bílkovin v daném časovém rozmezí a za daných podmínek
- 3) ukázat poločas rozpadu nově syntetizované bílkoviny
- 4) ukázat putování a translokaci bílkovin v buňce
- 5) ukázat posttranslační modifikace typu glykosylace a fosforylace
- 6) využít N-glykosylace bílkovin ke studiu jejich funkce pomocí inhibitorů glykosylace
- 7) ukázat produkty translace in vitro a glykosylace (kotransklace) in vitro
- 8) spojit metodu transkripce in vitro, translace a kotransklace in vitro k zviditelnění nascentního a posttranslačně modifikovaného bílkovinného produktu analyzovaného genu

Z méně obvyklých metod se chci zmínit o izolaci buněčných stěn a o posttranslačních modifikacích, o N-glykosylacích.

### Izolace buněčných stěn

Cílem práce je získání stěnové frakce bez kontaminace cytozolem. Metoda je založena na plasmolyze a následném oddělení stěnové frakce centrifugací přes cukerný polštářek při nízkých hodnotách rpm (Fry 1991). Metoda je vhodná pro izolaci stěn somatických i gametofytických buněk. Minimální navážka čerstvé hmoty je 10 mg.

Postup práce:

Homogenizaci pufrům (40% sacharóza, 10mM DTT, 20 mM HEPES pH 7,5 /NaOH/) je třeba dělat ve třence, bez dusíku a bez písku. Po homogenizaci probíhá plasmolýza po 30' při 0°C. Dalším krokem je sonikace, kdy počet 1/2 minutových sonikací je nutno stanovit na základě průběžné mikroskopické kontroly a analýzy cytosolických bílkovin uvolňovaných z homogenátu. Očištěné stěny jsou odděleny

centrifugací přes polštářek: 50% sacharóza, 10mM DTT, 20mM Hepes pH 7,5. Podíl polštářku a homogenátu je 1:1. Následuje centrifugace - 15' / 14 000g / 3°C. Sedimentované stěny se smíchají s 2mM merkaptóetanolém a uchovávají se při -20°C. Před dalším zpracováním je merkaptóetanol pečlivě vymyt vodou a stěny jsou zmrazeny v tekutém dusíku. Zmražené stěny jsou homogenizovány pufrém bez detergentů a soli a po centrifugaci je hladina bílkovin v supernatantu testována kvantitativně i kvalitativně a tím stanovena čistota preparace. Supernatant takto získaný by neměl obsahovat žádné bílkoviny. Nekovalentně i kovalentně vázané bílkoviny stěn jsou příslušnými pufrými extrahovány a děleny na 1-D či 2-D SDS PAGE.

### **Analýza glykoproteinů pomocí inhibitorů N-glykosylace.**

Metoda je použitelná pro N-glykosylované a de novo syntetizované bílkoviny (ověřeno lektinem ConA na W-blotu a fluorograficky po aplikaci značených aminokyselin). Při studiu N-glykoproteinů je možno použít inhibitorů glykosylace, tunikamycinu a castanosperminu (Elbein 1987).

Tunicamycin v rozsahu 200ng-200ug/1ml může zcela zablokovat navazování glykanového řetězce na nascentní bílkovinu syntetizovanou na ER. Objevují se tak plně glykosylované a deglykosylované formy příslušné bílkoviny. Molekulová hmotnost nascentní podoby bílkoviny je prvním důležitým údajem. Sledování translokace obou forem studované bílkoviny do vylisovaných buněčných kompartmentů ukáže roli glykanu při ochraně proti proteázám a při putování buňkou. Vzhledem ke specifčnosti reakce tunikamycinu je možno z poruchy buněčných funkcí po jeho aplikaci usuzovat na funkci příslušného glykoproteinu.

Castanospermin je nutno dodávat ve vyšší koncentraci, od 250ug-900ug/1ml. Tento inhibitor blokuje glukozidázu I a II, takže nově syntetizovaný glykoprotein odchází z ER nadbytečně glykosylován a glykoprotein má vyšší molekulovou hmotnost. Tato forma glykanu nedovoluje pokračovat v dalších, funkčně nejdůležitějších glykosylacích, které probíhají na Golgi. Kombinací obou inhibitorů je možno získat důležité informace o roli glykanů a tím i o roli glykoproteinu v buňce.

## SPOTs- nová technika pro analýzu epitopů protilátek

Čeřovská, N., Moravec, T.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6  
tel: 02/243 101 08

---

### **Princip metody:**

V současné době existují dva rozdílné přístupy k vytvoření kolekce peptidových sekvencí sloužících pro studium vazebných interakcí peptid-protein, genetický a syntetický. Genetický přístup zahrnuje klonování: a bakteriální expresi náhodných DNA fragmentů jako fúzních proteinů a následný imunochemický rozbor produkovaných proteinů a sekvenční analýzu pozitivních klonů.

Druhý, syntetický přístup, je reprezentován metodou syntézy peptidů na pevné fázi. Repräsentantem tohoto přístupu je např. systém SPOTs dodávaný firmou Cambridge Research Biochemicals. SPOTs je nová technika, která umožňuje syntézu stovek peptidů na pevné fázi ve formě vhodné pro systematickou analýzu epitopů protilátek. Systém je jednoduchý, rychlý a relativně ekonomický ve spotřebě reagensů. Pevný nosič s navázaným peptidem je možno po regeneraci (odvázání protilátek) použít opakovaně, a tak jedna syntéza poslouží pro otestování vazebných vlastností více protilátek.

SPOTs je metoda, pomocí které mohou být simultánně syntetizovány peptidy na derivatizované celulózové membráně a následně analyzována jejich imunologická reaktivita. Membrána je derivatizována tak, že nese volné aminoskupiny. Tyto volné aminoskupiny jsou uspořádány v malých kruhových skvrnách (spotech) v matici 8x12.

Pentafluorophenyl nebo N-hydroxy-oxo-dihydro-benzotriazin (Dhbt) estery aminokyselin chráněných pomocí skupiny Fmoc (9-fluorenylmetoxykarbonyl) se v prvním kroku naesterifikují na volné hydroxylové skupiny celulózové membrány do spotů, které byly označeny výrobcem již před navázáním první aminokyseliny pomocí bromfenolové modři (BPB). Po promytí a acylaci všech zbývajících volných aminoskupin se membrána inkubuje v piperidinu, který uvolní Fmoc chráněné funkční alfa aminoskupiny. Ty se opět vybarví BPB. Tato volná aminoskupina pak umožňuje peptidové vazby s další aminokyselinou.

Po ukončení syntézy se peptidy navázané na membráně analyzují nepřímým imunologickým tasterem za užití chromogenního substrátu. Pozitivní reakce protilátek s nasyntetizovanými peptidy se projeví vybarvením spotu. Po ukončení imunochemického testu může být membrána regenerována, protilátky odvázány a nasyntetizované peptidové determinanty lze použít pro další imunoreakce.

### **Laboratorní vybavení:**

Pro první použití si je nejlépe opatřit SPOTs kit od firmy od Cambridge Research Biochemicals, který obsahuje i vše potřebné, včetně programu pro generování sekvencí syntetizovaných peptidů. Mimo speciálních chemikálií (např. chráněné estery aminokyselin, membrány, rozpouštědla, molekulová síta, protilátky) je nutné mít funkční digestoř, třepačku, automatické pipety na odměření různých objemů, teflonovou misku se skleněným víčkem pro provedení syntézy. Dále je nutné mít zajištěnou odbornou likvidaci použitých organických rozpouštědel.

### **Pracovní postup:**

Nejprve se musí připravit a otestovat používaná rozpouštědla na nepřítomnost volných aminů, které by interferovaly s reakcí BPB. a alfa aminoskupiny aminokyselin. . Nevyhovují-li komerčně dodávaná rozpouštědla (N, N-dimethylformamid (DMF), 1-Methyl 2-pyrrolidon (NMP)) je nutné je přečistit přes molekulová síta 4A.

Po té si musíme rozvrhnout počet vazebných kroků v pracovním dnu, jeden cyklus trvá přibližně 90 min.

Navážíme estery aminokyselin, rozpustíme v NMP a rozdělíme na několik dávek, uskladníme je při -70° C, alikvoty používané tentýž den stačí uchovat při -20° C. (Pozor na nestabilitu argininového derivátu, musí se odvažovat pro každý krok čerstvý!)

Aminokyseliny nanášíme podle schématu generovaného počítačovým programem, který je součástí kitu, nebo dle vlastního schématu do modrých spotů na membránu. Přidáním acetanhydridu dochází k acylaci všech nezreagovaných aminoskupin. Dále se působením roztoku piperidinu v DMF odštěpí Fmoc chránící skupina z alfa aminoskupiny.

Posledním krokem syntézy je vybarvení spotu reakcí BPB s alfa aminoskupinou. Mezi jednotlivými kroky je membrána několikrát promývána DMF a dalšími rozpouštědly. Po skončení kteréhokoliv cyklu lze syntézu přerušit, tj. membránu vysušit metanolem a uschovat vakuově zatavenou v igelitovém sáčku při -20° C a kdykoli pokračovat v reakci. Po skončení posledního cyklu syntézy se musí odstranit ochranné skupiny na postranních řetězcích aminokyselin v peptidu kyselinou trifluoroctovou v dichlormetanu. Po následném vymytí a vysušení je membrána připravena pro imunochemickou reakci. Její podstata spočívá ve vazbě příslušné protilátky se specifickou aminokyselinovou sekvencí (nasyntetizovaným peptidem), reprezentující spojitý konformačně nezávislý epitop. Jde v podstatě o formu ELISA testu na celulózové membráně. Jako sekundární protilátka se používá protilátka značená beta galaktosidázou, jejíž chromogen se snadněji odstraňuje z membrány při regeneraci.

Výsledky imunoreakce se vyhodnocují vizuálně podle zabarvení skvrn.

Metoda je velmi elegantní, rychlá (stovky peptidů v průběhu několika dnů), finálně náročnější.

Uskalí metody:

Metoda je velmi náročná na soustředění, na každý z téměř stovky spotů se nanáší jiná aminokyselina, jediné překápnutí zcela mění syntetizovanou sekvenci. Dále je třeba přísně dodržovat pravidla pro práci s rozpouštědly (při kontaktu odpadní TFA s DMF může dojít k prudké exotermní reakci či explozi).

### Tipy a triky:

Naším vylepšením metody je používání N, N -dimethylacetamidu místo N, N-formamidu. Dimethylacetamid je mnohem stabilnější po otevření, neobsahuje volné aminoskupiny a tím odpadá příšerná a zdlouhavá práce při přípravě molekulových sít (žihání sít při vysoké teplotě) a následně časově náročné čištění rozpouštědel. DMF, komerčně dodávaný v deklarované čistotě se ukázal jako velmi nestabilní a po ve velmi krátké době otevření obsahoval volné aminy.

### Srovnání s alternativními metodami:

Podobná metoda syntézy peptidů (pin method, ) pro tyto účely byla navržena Geysenem et al., (1984). Její podstata spočívá v syntéze peptidů na špicích polyakrylátem potažených polyetylenových hrotů. Výhodou SPOTs metody je možnost opětovného použití regenerované membrány pro několik protilátek.

Vedle zde uvedené metody SPOTscan lze uvedenou metodu použít i pro syntézu analogických peptidů (SPOTsalogue) a též pro určení velikosti epitopu (SPOTsize) nebo pro namnožení určité proteinové sekvence (SPOTsalot).

### Literatura:

- Blankenmeyer-Menge B. and Frank, R., (1990). New methods for the simultaneous multiple synthesis of protected peptide fragments on cellulose disc supports. In "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis"- 1989, (Epton, R., ed. ), Chapman and Hall Medical, London pp, 1-10.
- Blankenmeyer-Menge B., Nimtz M. and Frank R. (1990). An efficient method for anchoring Fmoc-amino acids to hydroxyl-functionalised solid supports. Tetrahedron letters, 31, No. 12, 1701-1704.
- Geysen H. M., Meloan R. H. and Barteling, S. J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3998-4002

## Studies of cytokinin biosynthesis and metabolism

Dobrev, P., Kamínek, M.

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha 6  
tel: 02/36 83 05, 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59 , e-mail: dobrev@ueb.cas.cz

---

### 1. General considerations

Biosynthesis of compounds is a part of plant metabolism in which the product of biosynthesis is simultaneously metabolite of its precursor(s). However, the approach to biosynthesis and metabolism studies of particular substance is different. Biosynthesis studies are focused on investigation of biochemical pathways leading to synthesis of compound(s) of interest. On the other hand in metabolism studies the fate of compound of interest in biological system is analyzed. Several important aspects have to be considered before beginning of studies of biosynthesis and metabolism :

- *Choice of biological material.* Ideally, a biological system rich in investigated compounds which have already been qualitatively and quantitatively characterized should be used.

- *Choice of precursor.* In *in vivo* biosynthesis studies substances suspected to be precursors of investigated compound(s) are fed to the tissue. The right precursor should be specific for investigated compound(s), i.e. with high rate of conversion. Good permeability of precursor into tissue is also necessary. Precursor has to be available in radioactive or heavy labeled form.

- *Choice of detection mode of products and intermediates.*

a) Heavy atom labeled precursor

*Advantages:* Identification of products by mass spectrometric(MS) detector is the most unambiguous, allowing work without radioactivity.

*Disadvantages:* Limiting factor is the sensitivity of MS-detector. If the rate of conversion of substrate(s) to product(s) is low, the tissue must be fed with high amounts of precursor to obtain detectable amounts of product(s). This, however, can be expensive and nonphysiological. The heavy labeled products are "visible" only if their molecular masses are known, in other words one must have an idea what products to expect.

b) Radioactivity labeled precursor

*Advantages:* Precursor of high specific activity can be applied in low ( physiological ) concentration. All products are radioactively "visible".

*Disadvantages:* Identification, based only on chromatographic properties is questionable, identity of products should be confirmed by additional enzymatic and chemical conversions. Work with radioactivity.

### 2. Cytokinins as object of biosynthesis and metabolism studies

In general, studies of biosynthesis and metabolism of cytokinins are hampered by the extremely low levels of these compounds in plant tissues. As with other plant hormones, levels found are  $10^{-9}$  up to  $10^{-6}$  mol.(kgFW)<sup>-1</sup>. Use of plant material with high cytokinin content and turnover, such as actively dividing tissues, is preferable. Another difficulty is caused by the central role of the most likely cytokinin precursors (adenine, adenosine or its nucleotides, mevalonic acid) in plant metabolism. Thus, a major part of the precursor is incorporated into common purine metabolites, and only very small part is incorporated into cytokinins. Due to this low conversion rate the use of radiolabeled precursor is preferred. Most of investigations in which mevalonic acid (precursor of isoprenoids- constituents of side chain of cytokinins) was used as precursor of cytokinins, were unsuccessful.

### 3. Procedures in study of cytokinin biosynthesis and metabolism

- Application of the precursor.



Solution containing radioactive precursor ( most often  $^3\text{H}$ - or  $^{14}\text{C}$ -Ade) can be (1) directly applied on the surface of the tissue, (2) introduced in well, from which is sucked by an organ or (3) added to incubation mixture in which tissue is submersed.

Appropriate incubation conditions, such as optimal temperature (25-30°C), buffered pH and shaking can improve the uptake of precursor. Incubation time should be neither very short to allow uptake of enough radioactivity by cells, nor too long to prevent further metabolite conversions ( usually 1-10 hours).

- Extraction and purification of metabolites.

Extraction proceeds at low temperatures (L -20°C) with extractant minimizing activities of phosphatases, e.g. 60% methanol, 5% formic acid, 35% water(v/v).

Metabolites can be purified by standard procedure for determination of endogenous cytokinins, as e.g.: Extract is passed through C18 column to remove most of lipophilic contaminants.

After evaporation and redissolving in acidic buffer (pH=3), the sample is applied to cation exchange resin SP-Sephadex. This exchanger shows very good retention and high recoveries for cytokinin bases, ribosides and glucosides.

Cytokinin nucleotides are purified by anion exchange chromatography on DEAE-Sephadex.

-Identification of products.

Unambiguous identification of the radioactive products is only possible by applying of combination of chromatographic, enzymatic and chemical methods.

a) Chromatographic methods

Chromatographic identification is based on the coincidence of retention times of radioactive products with standards. The metabolites are run on two or more chromatographic systems with different mobile and stationary phases. No shift of the retention times of product from the standard should occur when changing to other chromatographic system. Column chromatography (including IAC), paper chromatography, 1D and 2D-TLC, and HPLC are used.

b) Enzymatic methods

Cytokinin nucleotides are identified enzymatically by treatment with nucleotidase. The released riboside is identified chromatographically. 5'-Nucleotidase is used for determination of 5'-phosphates. Cytokinin 3- and O-glucosides are deglycosylated by b-glucosidase and identified as corresponding aglucons.

c) Chemical methods

Treatment with diluted acids (HCl or TFA) removes ribose moiety and hydrolyzes the double bond of the side chain.

Sodium periodate with subsequent addition of cyclohexamine removes the ribose and cleaves the side chain.

Diluted aqueous permanganate at neutral pH and room temperature oxidizes the double bond and cleaves the side chain.

The identification usually proceeds in this sequence:

First, the products are fractionated chromatographically. Then fractions of interest are treated enzymatically and/or chemically and are again chromatographed. Shifts of retention times should be observed depending on the treatment.

Literature:

Hall R.H., (1970) N<sup>6</sup>-(D<sup>2</sup>-Isopentenyl)adenosine: Chemical reactions, biosynthesis, metabolism, and significance to the structure and function of tRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 10, pp 57-86

Horgan R., Palni L.M.S., Scott I., and McGaw B. (1881) Cytokinin biosynthesis and metabolism in *Vinca rosea* crown gall tissue. In: *Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins*. Eds. Guern J. and Péaud-Lenoël C. Springer-Verlag, Berlin, pp 56-65

- Letham D.S. (1994) Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: *Cytokinins Chemistry, Activity and Function*. Eds. Mok, D. and Mok, M. CRC Press, Boca Raton, pp. 57-80.
- Letham D.S. and Palni L. M. S. (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, vol. 34, pp 163-197

## Frakcionace bílkovin z vegetativních částí rostlin na základě jejich rozdílné rozpustnosti

Faltus, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, oddělení šlechtitelských metod, Drnovská 507, 16106 Praha 6 Ruzyně.  
tel: (420) 02/36 08 51-9, fax: (420) 02/36 52 28, 02/36 52 29, 02/36 58 84, e-mail: faltus@hb.vurv.cz

Tato metoda představuje postupnou chemickou extrakci bílkovin z vegetativních částí rostlin pomocí pufrů o různé iontové síle a různých detergentů. Frakcionace bílkovin je založena na jejich rozdílné rozpustnosti, která je ovlivněna způsobem a silou vazby bílkovin. Podmínkou při vypracování tohoto postupu bylo zachování molekul bílkovin při extrakci v nativním stavu, aby bylo možné stanovit tepelnou stabilitu bílkovin v jednotlivých frakcích a izolovat subfrakce tzv. "heat-stable" (nebo také "boiling-soluble") bílkovin. To znamená bílkovin, které při teplotě varu (100°C) nedenaturují a zůstávají rozpustné.

Při extrakci bílkovin jsou postupně získány čtyři frakce. První frakce, získaná pomocí pufru o nízké iontové síle, obsahuje rozpustné bílkoviny. Druhá frakce je získána pufrům o vysoké iontové síle a obsahuje bílkoviny vázané v pletivech převážně polárními interakcemi. Třetí frakce je získána pufrům o vysoké iontové síle obsahujícím neiontový detergent. Bílkoviny této frakce jsou vázány hydrofobními silami. Ve všech těchto frakcích nedochází při extrakci k denaturaci bílkovin, a proto je u nich možné izolovat subfrakce tepelně stabilních bílkovin. Čtvrtá frakce je extrahována pufrům o vysoké iontové síle obsahujícím iontový detergent. Při extrakci dochází ke ztrátě nativního charakteru molekul bílkovin, a proto zde není možné izolovat subfrakce tepelně stabilních bílkovin. Tento krok extrakce byl zařazen pro stanovení a izolaci bílkovin, jejichž vazba nebyla překonána v prvních třech krocích extrakce.

**Chemikálie:** Tris, HCl, NaOH, sacharosa, EDTA, PMSF, 2-merkaptoethanol, nerozpustný PVP, Triton X-100, SDS, aceton, redestilovaná voda, tekutý dusík.

**Přístroje:** Chlazená centrifuga (16000g), laboratorní mixer, mrazák, pH-metr, teplotně regulovaná vodní lázeň, analytické váhy, předvážky.

**Pracovní postup:** V předem vychlazené třecí misce rozetřeme 1g rostlinného materiálu v tekutém dusíku. Přidáme 0,05g nerozpustného PVP a 5ml homogenizačního pufru o nízké iontové síle (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 10%(w/v) sacharosa, 5 mM EDTA, 1%(w/v) PMSF, 1%(v/v) 2-merkaptoethanol). Homogenát centrifugujeme 20 minut při 16000 g v chladu. Supernatant obsahuje frakci rozpustných bílkovin. Sediment přelijeme 5ml extrakčního pufru o vysoké iontové síle (0,5 M Tris-HCl, pH 7,2, 10%(w/v) sacharosa, 5 mM EDTA, 1%(w/v) PMSF, 1%(v/v) 2-merkaptoethanol). Sediment rozsuspendujeme skleněnou tyčinkou a po 10 minutách extrakce v ledové lázni třepeme 1 minutu. Po dalších 10 minutách extrakce v ledové lázni třepeme další minutu a opět necháme 10 minut extrahovat v ledové lázni. Centrifugace probíhá za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Supernatant obsahuje frakci bílkovin vázaných polárními interakcemi. Extrakce další frakce bílkovin i centrifugace probíhají obdobným způsobem jako v předchozím případě; extrakční pufr o vysoké iontové síle obsahuje navíc neiontový detergent Triton X-100 (3% v/v). Získaná frakce obsahuje bílkoviny vázané hydrofobními silami. Poslední frakce je extrahována a centrifugována obdobným způsobem jako předchozí dvě frakce, ale při laboratorní teplotě. Extrakční pufr o vysoké iontové síle obsahuje v tomto případě iontový detergent SDS (1% w/v), který způsobí denaturaci extrahovaných bílkovin. Izolované frakce bílkovin rozpipetujeme po 200 ml do mikrozkušavek a přelijeme 1 ml vychlazeného acetonu s 1% (v/v) 2-merkaptoethanolem a uchováme v mrazáku při teplotě minimálně -20°C.

Izolované frakce bílkovin jsou dále rozděleny pomocí 1D SDS-PAGE (Čapková et al., 1987). Elektroforetická spektra bílkovin jsou vyhodnocena pomocí softwaru Elfoman 2.0-BETA.

Cena chemikálií potřebných na zpracování jednoho vzorku, tzn. 1g rostlinného materiálu činí asi 50 Kč. Jeden vzorek (1g rostlinného materiálu) se zpracuje asi za 4 hodiny a získají se čtyři frakce a z nich případně další tři subfrakce tepelně stabilních bílkovin.

Měření obsahu bílkovin pomocí běžně užívaných metod (Lowry et al., 1951, Bradford, 1976 a Warburg a Christian, 1942) ruší složení extrakčních pufrů a přítomnost detergentů. Část extrahovaných bílkovin, které zůstávají v sedimentu po slítí supernatantu, se dostává do následné frakce bílkovin. To se může projevit v elektroforetickém spektru zejména u bílkovin, které jsou silně zastoupené.

Tento postup byl odzkoušen pro zelené listy obilovin. Velikost zpracovávaného vzorku je v tomto postupu ovlivněna paralelní izolací tepelně stabilních subfrakcí bílkovin prováděnou v naší laboratoři. Pokud nepotřebujeme získat tyto subfrakce lze použít jen čtvrtinu vzorku. Pro stanovení obsahu bílkovin lze doporučit metodu podle Schaffnera a Weissmanna (1973). Pro dokonalé oddělení bílkovin do jednotlivých frakcí je třeba po každé extrakci provádět promývání sedimentu pomocí pufru se stejným složením jako při její extrakci. Použití neiontového detergentu Triton X-100 se ukázalo výhodnější než použití "zwitterionic" detergentu CHAPS. Triton X-100 byl účinnější při extrakci hydrofobně vázaných bílkovin než CHAPS. Vyšší iontová síla extrakčních pufrů a použití sacharosy v tomto postupu zlepšuje následné rozlišení bílkovin rozdělených pomocí elektroforézy.

Dunbar (1988) uvádí čtyři základní způsoby frakcionace bílkovin. Frakcionaci organel pomocí centrifugace a elektroforézy, frakcionace na základě rozpustnosti ve vodě, metody chemické extrakce pro analýzu bílkovin a diferenciální adsorpci bílkovin na nabitých maticích. Frakcionace organel pomocí centrifugace vyžaduje poměrně drahé vybavení (ultracentrifuga) a také je časově dosti náročná. Při frakcionace podle rozpustnosti bílkovin ve vodě dochází při získání ve vodě nerozpustné frakce k denaturaci bílkovin a není možné zjistit u nich jejich tepelnou stabilitu. Metody chemické extrakce jsou založeny na odolnosti a citlivosti buněčných bílkovin k použitým extrakčním činidlům. Při extrakci se obvykle užívá pro každou frakci samostatný vzorek. Diferenciální adsorpce bílkovin na nabitých maticích neřeší otázku extrakce bílkovin, ale jejich následné dělení na základě fyzikálně chemických a biologických vlastností.

Zde uváděná metoda chemické frakcionace spočívá v postupné extrakci bílkovin z jednoho vzorku na základě různého způsobu a různé síly vazby bílkovin. Není náročná na přístrojové vybavení (centrifuga do 16000g). Výhodou této metody je získání tří různě definovaných frakcí bílkovin v nativním stavu z jednoho vzorku a možnost izolace subfrakcí tepelně stabilních bílkovin.

#### Literatura:

- Bradford, M.M., 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Čapková, V., Hrabětová, E. a Tupý, J., 1987: Protein changes in tobacco pollen culture; a newly synthesised protein related to pollen tube growth. *J. Plant Physiol.* 130: 307-314.
- Dunbar, B.S., 1988: Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York, 372 p.p., ISBN 0-306-42839-3.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. a Randall, H.J., 1951: Protein measurement with the Folin fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Schaffner, W. a Weissmann, P.C., 1973: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56: 502-514.
- Warburg, O. a Christian, W., 1942: Isolierung und krystalisation des Garungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421.

Další doporučená literatura:

Bollag, D.M. a Edelstein, 1991: Protein methods. Wiley-Liss, Inc., New York, 230 p.p., ISBN 80-200-0180-8.

Králová, M., Draždák, K., Pospíšil, Hadačová, V., Klozová, E., Luštinec, J., Kutáček, M. a Sahulka, J., 1994: Vybrané metody chemické analýzy půd a rostlin. Studie ČSAV, č. 12, Academia, 160 p.p., ISBN 80-200-0180-8.

## Izolace a identifikace vnitrobuněčných membrán

Feltl, T.

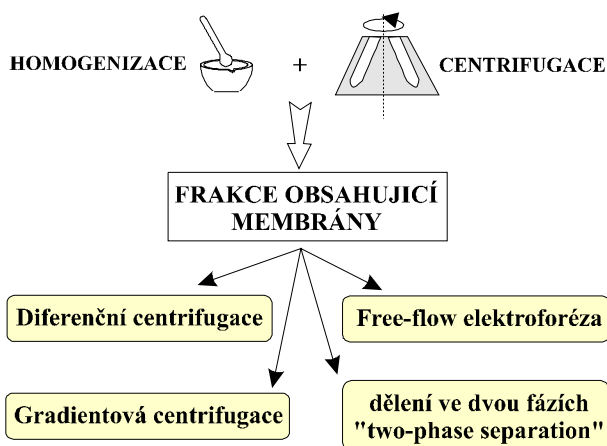
Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 16/15, 166 30 Praha 6  
tel: 02/36 81 56, fax: 02/36 81 59, e-mail: feltl@ueb.cas.cz

Při studiu funkcí jednotlivých proteinů (např. enzymů, receptorů, membránových kanálů, přenašečů, apod.) dříve nebo později narazíme na otázku lokalizace daného proteinu. Je zřejmé, že kompartmentace metabolických procesů je nezbytnou součástí jednotlivých procesů a regulačních mechanismů a bez informace, kde v buňce se studovaný protein nachází nelze sestavit funkční schéma studovaného procesu.

Zásadně lze rozdělit proteiny na cytosolické a membránové (k membránovým proteinům budu v tomto přehledu počítat i proteiny pevně asociované s membránami). Možná je ještě třetí varianta a to, že studovaný protein se nachází uvnitř některé z organel. Prvním a nezbytným krokem studia těchto proteinů je izolace dané organely v intaktním stavu.

Jde-li o membránový protein, je nutné zjistit v membráně které organely se protein nachází. K tomu je potřeba rozdělit směs membránových vezikulů získaných při homogenizaci (viz. dále). Následující přehled by měl ukázat možné přístupy a postupy používané při takovémto dělení.

(Je též možné při získávání určitých membránových frakcí vycházet z izolovaných organel, např. z izolovaných vakuol při získávání tonoplastu. Nevýhodou tohoto postupu je však poměrně náročná izolace dané organely v prvním kroku a s tím spojená malá výtěžnost celého postupu. Výhodou je naopak vysoká čistota výsledné frakce. Podrobněji se zde o tomto postupu nebudu zmiňovat).



Obr.č.1: Některé metody použitelné při dělení vnitrobuněčných membrán.

### Některé z možných přístupů (viz.obr.č.1)

#### Diferenční centrifugace

Nejhrubší, i když někdy postačující, rozdělení vnitrobuněčných komponent dosáhneme pomocí diferenční centrifugace. Tato metoda je založena na rozdílné hodnotě sedimentačního koeficientu složek směsi. V tabulce č. 1 jsou uvedeny podmínky pro sedimentaci různých částí rostlinné buňky. Pro některé složky, jako jádra, chloroplasty a mitochondrie je tato metoda dobře použitelná. Dělení membránových

buněčné části	$\times g_{max}$	čas (min)	g/min
celé buňky	500	5	2 500
jádra	500	7	3 500
chloroplasty	2 000	2	4 000
mitochondrie	6 000	15	90 000
Golgiho aparát	10 000	20	200 000
plasmatická membrána			
tonoplast	16 000	20	320 000
peroxisómy	17 500	20	350 000
endoplazmatické retikulum	17 500	20	350 000
opláštěné vesikly (mikrovesikly)	20 000	20	400 000

Tab.č.1: Parametry sedimentace některých buněčných částí v 0,25M sacharose.

veziklů ostatních typů je však většinou značně nedokonalé. Znečištění frakcí ostatními membránami stoupá, zejména pokud jde o endoplazmatické retikulum (ER), tonoplast a Golgiho aparát.

Protože pomocí diferenciální centrifugace nezískáme frakce vysoce obohacené o určitou složku, je využívána především pro přípravu hrubých frakcí, které jsou dále děleny pomocí některé z níže popisovaných metod (Prosser et al., 1989).

**Tipy, triky, náročnost:** Pokud jsme začali studovat lokalizaci určitého proteinu, přináší nám tato metoda prvotní informaci o přibližné lokalizaci proteinu. Na základě této informace můžeme volit další postup (např. rozsah sacharózového gradientu). Náročnost této metody závisí na počtu provedených centrifugací (viz. tab. č. 1).

### Příprava frakce membránových veziklů (mikrosomální frakce-MF)

Frakci obsahující vezikly vnitrobuněčných membrán připravíme pomocí dvou centrifugací, z přefiltrovaného homogenátu našeho materiálu. První centrifugací (5000 x g  $R_{av}$ , 15 min.) odstraníme nezhomogenizované buňky, fragmenty buněčných stěn, jádra, mitochondrie a chloroplasty. Supernatant obsahuje z velké části membránové vezikly a rozpustné látky. Pomocí druhé centrifugace (150 000 x g  $R_{av}$ , 45 min.) získáme sediment obsahující pouze membránové vezikly. Supernatant obsahuje rozpustné látky. Rehomogenizovaný sediment vnitrobuněčných membránových veziklů, mikrosomální frakce (MF), je výchozím materiálem pro další dělení.

Mikrosomální frakci tvoří směsná populace veziklů o velikosti 0,2  $\mu\text{m}$ -0,8  $\mu\text{m}$  (deDuve, 1964; Sze, 1985). Každý z veziklů je zpravidla tvořen pouze jedním typem membrány (Morre *et al.*, 1987). Membránové vezikly se mohou vyskytovat ve dvou formách, buď je zachována původní orientace membrány ("outside-out"), nebo je převrácená ("inside-out").

### Gradientová centrifugace

Pomocí gradientové centrifugace dosáhneme mnohem lepších výsledků, než v případě diferenční centrifugace. K dělení membránových veziklů dochází podle jejich vznášivé hustoty, která více či méně odpovídá určitému membránovému typu. Gradientovou centrifugaci můžeme rozdělit dle typu gradientu na kontinuální (hustota gradientu se mění postupně, příprava pomocí spojených nádob) a diskontinuální (hustota se mění krokově, příprava navrstvením určitého počtu roztoků o různé hustotě). Centrifugaci je možné také dělit na centrifugaci izopyknickou (částice sedimentují do vrstvy gradientu se stejnou vznášivou hustotou ( $r$ ) a zastaví se) a izokinetickou (částice sedimentují určitou rychlostí úměrnou svým sedimentačním koeficientům ( $S$ ), nedochází k dosažení hustotní rovnováhy). Maximálního rozlišení je možné dosáhnout postupnou kombinací dělení podle  $S$  a následně podle  $r$ . Konkrétní volba podmínek (použitá sloučenina pro tvorbu gradientu [nejčastěji sacharóza, pokud je na závalu vysoký osmotický tlak - hydrofilní sacharidy jako dextran nebo Ficoll], rozsah gradientu) centrifugace závisí na zpracovávaném materiálu. Problémem je oddělení PM od chloroplastových membrán, které mají velmi blízké vznášivé hustoty (Poole, 1984).

V případě izolace ER lze využít postupu, který kombinuje diskontinuální sach. gradienty s vysokým a s nízkým obsahem iontů  $\text{Mg}^{2+}$  (Lis a Weiler, 1994), které mají vliv na dělení ER (přechos sER na rER a zpět).

**Tipy, triky, náročnost:** Pokud nepracujeme s celými buňkami (resp. protoplasty) a nejde nám o zachování nízké hodnoty osmotického tlaku, je výhodné (zejména finančně) použít sacharózového gradientu. Nutné je použití sacharózy určené speciálně pro gradientové centrifugace. V průběhu experimentů nedoporučuji zaměřovat výrobce chemikálií (např. Sigma x Beckman - v obohacení výsledných frakcí určitými membránami byl prokazatelný rozdíl při použití sach. od uvedených firem). Včetně homogenizace materiálu je časově zvládnutelný celý postup během 2 dnů. Pokud použijem pro centr. gradientu ultracentrifugu (260 000 x g  $R_{av}$ , 2,5 hod. - nutno experimentálně stanovit, údaj pro MF z listů *Ch. rubrum*), je možné získat finální frakce během jednoho dne! Nevýhodou je nutnost vlastnit ultracentrifugu, kterou nezbytně potřebujeme pro přípravu MF.

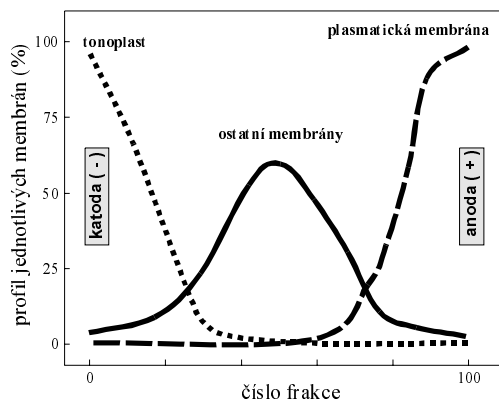
**Př.:** Pro dělení MF z listů *Ch. rubrum* bylo použito lineárního sacharózového gradientu 18-38% (hm./hm., v suspenzním pufru- 1,1 M glycerol, 5 mM DTT, 10 mM Tris-MES (pH 8,0)), izopyknická centrifugace (30 000 x g  $R_{av}$ , 15 hod.). Došlo k dobrému rozdělení membrán ER (rER x sER), PM, tonoplastu, mitochondrií. Ostatní membrány nebyly sledovány.

## Free-flow elektroforéza

Kontinuální free-flow elektroforéza (obr.č.2) je šetrná, relativně rychlá a efektivní separační metoda, použitelná k separaci proteinů, k dělení a izolaci živých buněk, buněčných organel a membránových systémů. Teoretickými aspekty použití této metody v biologii se zabývá práce Hanniga a Heidricha (1977). Fyzikální teorie metody je důkladně probrána v práci Hanniga a spolupracovníků (1975) a Zeillera a spolupracovníků (1975). Z hlediska preparace jednotlivých vnitrobuněčných membrán je zajímavá například možnost rozlišit membránové vezikly orientované “outside-out” a “inside-out”. Uplatnění bylo též nalezeno v separaci plazmatické membrány od tonoplastu (Auderset *et al.*, 1986), v přípravě vysoce čisté plazmatické membrány a tonoplastu (Canut *et al.*, 1988; Sandelius *et al.*, 1986; Canut *et al.*, 1990), popř. v separaci jiných vnitrobuněčných membrán (Klingler *et al.*, 1991). Pro purifikaci PM se dnes spíše častěji používá postup dělení ve dvou fázích, označovaný jako “two-phase” systém.

Vlastní metoda je založena na existenci “částic” s různou hustotou povrchového náboje, který je udílen “částici” jejími funkčními skupinami. Takováto “částice” je od ostatních “částic” více či méně separována působením elektrického pole v dělicí komoře.

Při typickém průběhu dělení (obr.č.3) získáme frakci vysoce obohacenou o tonoplast (blíže katody) a frakci vysoce obohacenou o PM (blíže anody). Ostatní membrány zůstávají uprostřed separačního pole.



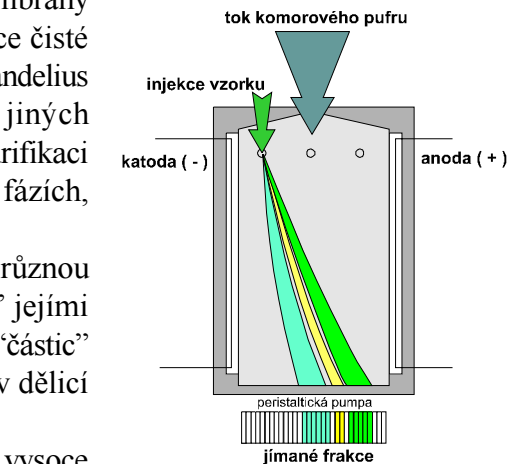
Obr.č.3: Typický průběh dělení membránových vezikul pomocí free-flow elektroforézy.

MF 3ml/hod., teplota komory 4°C. Složení pufrů komorový pufr-(vodivost 0,90 mS/cm), 15 mM trietanolamin, 4 mM octan draselný, 10 mM glukóza, 30 mM sacharóza, 240 mM glycin, pH 7,5 (upraveno ledovou kys.octovou), elektrodový pufr-(vodivost 1,93 mS/cm), 45 mM trietanolamin, 12 mM octan draselný, 720 mM glycin, pH 7,5.

## Dělení ve dvou fázích “two-phase separation”

Systém dělení ve dvoufázovém systému vodných polymerů se používá ke získání frakce vysoce obohacené o PM. Tato metoda, obdobně jako free-flow elektroforéza, dovoluje oddělit vezikly PM od chloroplastových membrán (což není dokonale možné pomocí centrifugace).

Dělení probíhá na základě různého povrchového náboje membrán. MF se smísí s dextranem T-500 (dex) a polyetylglykolem 3350 (PEG) obsahujícím NaCl nebo KCl (obr.č.4). Povrchový náboj se může u různých

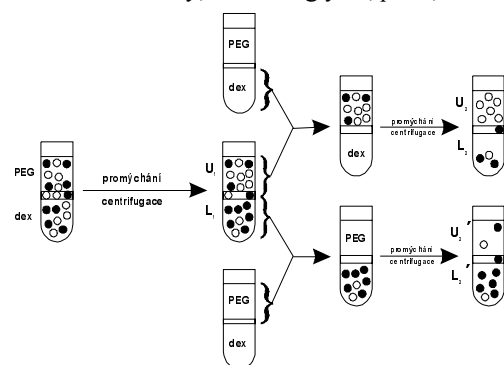


Obr.č.2: Schéma free-flow elektroforézy

**Tipy, triky, náročnost:** Pokud chceme oddělit tonoplast od membrán ER, nebo získat PM, je velmi výhodné využít této metody. Protože se vzorek pohybuje ve velmi úzkém prostoru mezi dvěma deskami, je důležité precizní resuspendování MF. Časově náročné je zejména odladění aplikace metody na určitý materiál. Postup, počínaje homogenizací materiálu, je možné zvládnout během dvou dnů. Doba vlastního dělení je závislá na rychlosti průtoku komorového pufru a rychlosti průtoku děleného vzorku.

Nevýhodou této metody je nutnost vlastnit free-flow elektroforézu. Přístroj, použitelný pro dělení rostlinného materiálu, se dle mých informací nenachází v naší republice.

**Př.:** Pro dělení MF z listů *Ch. rubrum* byla použita Free-flow elektroforéza Elphor VAP 22 (Bender & Hobein, Munich, Germany). Dělení probýhalo za těchto podmínek: proud 120mA, (napětí 1200V), průtok KP 4,5ml/frakci/hod., průtok



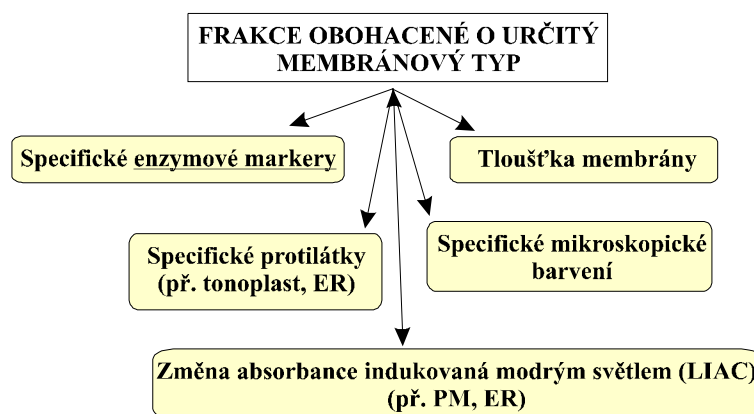
Obr.č.4: Znárodnění separace PM pomocí “two-phase” systému (PM-bílá kolečka)



rostlinných druhů lišit, je nutné vyzkoušet různé koncentraci dex, PEG, a soli (Morre *et al.*, 1987; Briskin *et al.*, 1987).

**Tipy, triky, náročnost:** PM připravená tímto způsobem vykazuje vysokou čistotu, a je ideální pro její studium. Důležité je použít centrifugačních kyvet z kvalitního skla (Corex, USA), nebo použít silikanizované sklo. Velkou výhodou metody je její rychlost. Celý postu je zvládnutelný během 4 hodin. Důležité je “nepřeloudovat” systém! Na 16 g směsi lze pro úspěšnou izolaci nanést MF z 12 g čerstvých listů špenátu, avšak pouze MF z 8 g čerstvých listů *Ch. rubrum*.

**Př.:** Pro získání frakce vysoce obohacené o PM z MF listů *Ch. rubrum* byl použit tento systém: 5,7 % (hm./hm.) dextran T-500, 5,7 % (hm./hm.) polyethylenglykol 3350, 3mM KCl, 0,5mM fosfátový pufr (pH 7,8), 0,22M sacharosa. Směs byla 20x promýchána a centrifugována ( $1500 \times g$   $R_{av}$ , 5 min.). Tento krok byl opakován do frakce  $U_3$  (viz. obr.č.4). Tato frakce byla vysoce obohacena o PM.



**Obr.č.5:** Některé z možností identifikace vnitrobuněčných membrán

Část buňky (b. membrána)	přibližná tloušťka	příklad markeru
Plazmatická membrána (PM)	10 nm	-glukansyntasa II -vanadáten inhibovaná $K^+$ -ATPasa -vazba N-1-naftylftalimové kys.
Tonoplast	7-9 nm	-nitratem inhibovaná $K^+$ -ATPasa -pyrofosfatáza
Mitochondrie	6 nm	-cytochrom c oxidasa (necitlivá k antimycinu A a k iontům $N_3^-$ )
Chloroplasty	6 nm	-chlorofyl
Golgiho aparát	5-9 nm	-latentní IDPasa -glukansyntasa I
Endoplazmatické retikulum (ER)	6 nm	-NAD(P)H-cytochrom c reductasa
Peroxisomy	6-7 nm	-katalasa, enzymy produkující $H_2O_2$
Jádra	6 nm	-DNA
Opláštěné vezikly (mikrovesikly)	-----	-klatrin (SDS-PAGE, 180-190 kDa)
Cytosol	-----	-laktát dehydrogenasa

**Tab.č.2:** Příklad markerů a přibližná tloušťka některých buněčných částí.

### Identifikace vnitrobuněčných membrán (obr.č.5)

- 1) specifické enzymové markery (Morre *et al.*, 1987; Widell a Larsson, 1990)  
Principem je měření aktivity enzymu, jehož výskyt je vázán na určitý membránový typ. Příkladů některých těchto markerů jsou v tabulce č.2.
- 2) měření tloušťky membrány (Morre *et al.*, 1987) viz. tabulka č.2
- 3) specifické mikroskopické barvení  
Pro identifikaci PM se používá např. barvení pomocí kys. fosforečnanowolframové (PTA) nebo kys. křemičitanowolframové (STA) (Widell a Larsson, 1990)
- 4) specifické protilátky  
Byly připraveny protilátky např. proti membránám ER a tonoplastu.
- 5) Změna absorpance indukovaná modrým světlem (LIAC) (Widell a Larsson, 1990)

Změna absorbance indukovaná modrým světlem souvisí s redukcí cytochromu typu b, a je používána jako marker PM. Světlem redukovatelný cytochrom je přítomný též v membráně ER.

Literatura:

- Auderset, G., Sandelius, A.S., Penel, C., Brightman, A., Greppin, H., Morre, D.J. (1986): Isolation of plasma-membrane and tonoplast fractions from spinach leaves by preparative free-flow electrophoresis and effect of photoinduction. *Physiol Plant* 68: 1-12.
- Briskin, D.P., Leonard, R.T., Hodges, T.K. (1987): Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods Enzymol* 148: 542-68.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A.M., Morre, D.J. (1988): Plasma membrane vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 86: 631-7.
- Canut, H., Brightman, A., Boudet, A.M., Morre, D.J. (1990): Tonoplast vesicles of opposite sidedness from soybean hypocotyls by preparative free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 94: 1149-56.
- de Duve, C. (1964): Principles of tissues fractionation. *J Theor Biol* 6: 33-59.
- Hannig, K., Wirth, H., Meyer, B.H., Zeiller, K. (1975): Free-flow electrophoresis I (Theoretical and experimental investigations of the mechanical and electrokinetic variables on the efficiency of the method). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 356: 1209-23
- Hannig, K., Heidrich, H.G. (1977): Continuous free-flow electrophoresis and its application in biology. *In Cell separation methods*. Bloenidal, H. (ed.), 95-115, North Holland Publishing Company.
- Klingler, H., Frosh, S., Wagner, E. (1991): In vitro effects of monoterpenes on chloroplast membranes. *Photosynth Res* 28: 109-18.
- Lis, H., Weiler, E.W. (1994): Ion-translocating ATPases in tendrils of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* 194: 169-80.
- Morre, D.J., Brightman, A.O., Sandelius, A.S. (1987): Membrane fractions from plant cells. *In Biological membranes a practical approach*. Findlay, J.B.C., Evans, W.H. (ed.), 37-68, IRL Press, Washington.
- Poole, R. J., Briskin, D. P., Krátký, Z., Johnston, R. M. (1984): Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet. *Plant Physiol.* 74:549-556.
- Prosser, V. a kolektiv (1989): Preparativní a analytické metody: Sedimentace (centrifugace). *In Experimentální metody biofyziky*. 74-77, Academia, Praha
- Sandelius, A.S., Penel, C., Auderset, G., Brightman, A., Millard, M., Morre, D.J. (1986): Isolation and highly purified fractions of plasma-membrane and tonoplast from the same homogenate of soybean hypocotyls by free-flow electrophoresis. *Plant Physiol* 81: 177-85.
- Sze, H. (1985): H<sup>+</sup>-translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 175-208.
- Widell, S., Larsson, C. (1990): A critical evaluation of markers used in plasma membrane purification. *In The plant plasma membrane*. Larsson, C., Moller, I.M. (ed.), 17-40, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Zeiller, K., Löser, R., Pascher, G., Hannig, K. (1975): Free-flow electrophoresis II (Analysis of the method with respect to preparative cell separation). *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 356: 1225-44.

## Stanovení rostlinného škrobu modifikovanou antronovou metodou, s využitím chloralhydrátu jako rozpouštědla

Grospietsch, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, Praha 6 - Ruzyně, 161 06  
tel: 02/36 08 51 1.362, fax: 02/36 52 28, e-mail: grospietsch@hb.vurv.cz

Při stanovování obsahu škrobu v rostlinném materiálu bývá největším problémem jeho extrakce. Nejčastěji se pro jeho převedení do roztoku používá kyselé, nebo zásadité hydrolyzy pomocí kyseliny chlorovodíkové, chloristé, nebo hydroxidu draselného. Jinou, poměrně málo známou látkou, která velice dobře rozpouští škrob (a nikoli celulózu a další polysacharidy) je chloralhydrát (1). Níže uvedená metodika je původní právě použitím chloralhydrátu jako extrakčního činidla ve spojení s následným kolorimetrickým stanovením škrobu pomocí antronu. Podstatou antronové metody, vypracované na přelomu 40. a 50. let (2,3,4), je tvorba barevného komplexu furfural-antron v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Intenzita zbarvení je úměrná koncentraci zkoumaného sacharidu (nejčastěji glukózy) a může být měřena spektrofotometricky.

### Metodika

- **stroje a nástroje:** z přístrojového vybavení je nutno vlastnit, nebo mít alespoň přístup k spektrofotometru, stolní centrifuze a vodní lázni (v nouzi stačí vařič). Pipety, třecí miska s tloučkem a zkumavky (nejlépe se zábrusovým špuntem), bývají obvyklým vybavením každé laboratoře. Z chemikálií je potřeba koncentrovaná kyselina sírová, antron, chloralhydrát, 80% etanol a destilovaná voda.

#### - vlastní postup:

- 1) namícháme potřebné množství antronového roztoku o koncentraci 0,2% (w/v), rozpuštěním naváženého množství antronu v koncentrované kyselině sírové. Roztok musí být jasně žlutý, jestliže zelená, máme nejspíš špinavé sklo.
- 2) asi 50-100mg rostlinného materiálu rozetřeme v třecí misce s 2ml 80% etanolu a slijeme do centrifugační zkumavky. Misku poté dvakrát vypláchneme 1,5 ml 80% etanolu a vše rovněž slijeme do centrifugačky.
- 3) centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g.
- 4) opatrně slijeme supernatant a pelet roztřepeme ve 4ml destilované vody.
- 5) centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g.
- 6) ještě jednou zopakujeme body 4) a 5).
- 7) slijeme supernatant. Nyní jsme se zbavili rozpustných cukrů a zůstal nám pelet, obsahující škrobová zrna a zbytky buněčných stěn.
- 8) k peletu v centrifugační zkumavce napipetujeme 1ml 1M roztoku chloralhydrátu a vzorky umístíme na 15 minut do vroucí vodní lázně. Během procedury se rozpustí amyloplasty a škrob přejde do roztoku.
- 9) vzorky vyjmeme z lázně a centrifugujeme 5 minut při 2000 - 3000g. Zbytky buněčných stěn sedimentují, zatímco škrob zůstane ve vodné fázi.
- 10) pipetou odsajeme 0,2 - 0,5ml supernatantu a zředíme v poměru 1:10 (nebo jiném, záleží na škrobnatosti konkrétního materiálu).
- 11) mezitím do čistých zkumavek se zábrusem napipetujeme 3ml připraveného antronového roztoku.
- 12) antron opatrně převrstvíme 1ml naředěného vzorku z bodu 10) a zkumavku dáme chladit do studené vody.
- 13) rychlým, ale důkladným protřepáním smísíme obě fáze pod proudem studené vody. Chlazení je nutné vzhledem k velkému množství tepla, které se uvolňuje při mísení vody s kyselinou. Rovněž je třeba mít v této fázi zkumavku odšpuntovanou, jinak hrozí nebezpečí vystřelení zátky a vystříknutí kyseliny s následnými neblahými účinky.

14) promíchané vzorky se inkubují 5 minut ve vroucí vodní lázni, kde dojde k vytvoření barevného komplexu a roztok změní zabarvení ze žluté na zelenou.

15) po vyjmutí z lázně se vzorky ochladí na pokojovou teplotu a změří se absorbance při vlnové délce 625nm.

**-vyhodnocení dat:** obsah škrobu se odečte z kalibrační křivky glukózy, kterou je nutno si předem sestrojít, nejlépe v rozsahu koncentrací 0 - 100mgml<sup>-1</sup>, kdy je závislost lineární a absorbance nepřesahuje 1,5. Přítomnost chloralhydrátu ve vzorku neovlivňuje absorbanci, ani neposouvá absorpční maximum. Metoda umožňuje detekovat už řádově jednotky mg glukózy v mililitru vzorku.

### Úskalí, tipy a triky

- základním požadavkem je maximální čistota, zvláště laboratorního skla, které má přijít do styku s antronovým roztokem. Vzhledem ke značné citlivosti metody stačí i nepatrné znečištění prachem, stopami celulózy a pod., aby došlo k chybám.

- pokud jde o stabilitu antronového roztoku, někteří autoři doporučují nepoužívat zcela čerstvý roztok, ale nechat ho alespoň 4 hodiny "uzrát". Rovněž příliš starý roztok není vhodný, neboť se časem rozkládá (za 5-10 dní, podle kvality chemikálií a podmínek prostředí) a mění zbarvení z jasně žlutého na žlutohnědé. Optimální je používat roztok do jednoho dne po namíchání.

- 1M roztok chloralhydrátu lze bez problémů uchovávat v zábrusové lahvi v chladničce. Při práci s ním je třeba dbát jisté opatrnosti, neboť dráždí pokožku a sliznice.

- dle osobních zkušeností není radno objednávat chloralhydrát u Sigmy, neboť se jedná o látku, která nesmí být vyvážena z Německa. Lze ho však získat bez problémů od firmy Fluka.

- při práci s rostlinným materiálem obsahujícím pryskyřice, jako například jehlice konifer, je nutné v úvodní extrakci nahradit etanol 80% acetonem a použít ho nejméně ve dvou stupních.

### Finanční a časová náročnost, srovnání s alternativními metodami

Pokud jde o finanční náklady, vyjde zpracování 100 vzorků na 250-350,- Kč, přičemž většina této částky padne na vrub etanolu a kyseliny sírové. Doba zpracování 8 vzorků (počet míst v centrifúze) činí 2-2,5 hodiny, což umožňuje teoreticky zpracovat až 32 vzorků během osmi hodin. V porovnání s metodami, využívajícími k extrakci škrobu kyseliny chloristé (doba extrakce až 12 hodin), místo chloralhydrátu (doba extrakce 15 minut), je zde výrazná úspora času. Rovněž odpadá práce s další agresivní kyselinou.

Ve srovnání s postupy, využívajícími enzymatických, nebo chromatografických metod stanovení obsahu škrobu je hlavní výhodou až o řád nižší cena zpracování jednoho vzorku.

### Literatura:

1. Bourne, E.J., Weigel, H. Bacterial Polysaccharides - Extraction with Chloral Hydrate. in *Methods in Carbohydrate Chemistry, vol.V- General Polysaccharides* Edited by Roy L. Whistler, Academic Press New York and London, 78-80 (1965)
2. Scott, T.A., Melvin, E.H. Determination of Dextran with Anthrone. *Analytical Chemistry* **25**, 1656-1661 (1953)
3. Viles, F.J., Silverman, L. Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical Chemistry* **21** 950-953 (1949)
4. Yemm, E.W., Willis A.J. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal* **57**, 508-514 (1954)

## Jak studovat receptory pro rostlinné hormony ?

Kamínek, M., Zažímalová, E.\*

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6

tel: 02/36 83 05, 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59 e-mail: kaminek@mbox.cernet.cz, zazim@site.cas.cz.

Koncept hormonální regulace růstu a vývoje rostlin předpokládá (1) přenos chemického signálu reprezentovaného fytohormonem, (2) jeho rozpoznání v cílovém místě a (3) jeho “překlad” ve formě fyziologické odpovědi. Hormonální signály jsou rozpoznávány a přijímány specifickými receptory, které k tomu, aby mohly plnit svoji specifickou funkci, musí splňovat řadu kritérií. Ideální receptor se vyznačuje (1) vysokou afinitou k ligandu ( $K_d < 10^{-8}$  M) umožňující vazbu významného množství ligandu přítomného obvykle v extrémně nízkých koncentracích, (2) nízkou kapacitou nutnou pro nasycení vazby při vysokém zředění ligandu, (3) vysokou specifitou, (4) dynamickou rovnováhou mezi vázaným a volným ligandem a (5) fyziologickou “smysluplností” vazby, tzn. vazba ligandu musí po přenosu signálu kaskádou navazujících procesů vést k odpovídající fyziologické odpovědi (viz Barbier-Brygoo 1994, Libbenga a Mennes 1995, Venis a Napier 1995). Tato přísná kritéria splňuje řada receptorů živočišných hormonů, zatímco v rostlinách bylo identifikováno pouze několik bílkovin vázajících auxin (přehledy Jones 1994, Napier a Venis 1995, Venis a Napier 1995, Macdonald 1997, Zažímalová et al. 1997), kyselinu abscisovou (přehled Assmann 1994) a etylén (přehled Harpham 1996), které lze považovat za hormonální receptory. Ostatní bílkoviny vázající fytohormony, u kterých nebyla doložena fyziologická významnost vazby fytohormonu, označujeme jako “vazebné bílkoviny” (VB) či “vazebná místa”.

VB jsou většinou vázány na buněčné membrány a vyskytují se velmi malých koncentracích. Vzhledem k této skutečnosti a dále k jejich citlivosti vůči prostředí a k nutnosti uchovat jejich specifické vlastnosti (viz výše) je třeba při jejich studiu používat specifických šetrných metod, které zahrnují:

- (1) Extrakci, čištění a izolaci VB
- (2) Biochemickou charakterisaci VB (*molekulární*: stanovení molekulové hmotnosti nativního proteinu a jeho podjednotek, glykosylace proteinu, pI, imunologické příbuznosti s jinými proteiny, sekvence aminokyselin, vymezení vazebného místa, identifikaci genů kódujících VB a s nimi spřažených promotorů, aj.; *kinetickou*: určení vazebné kapacity, afinity k fytohormonu a specifity vazby, počtu vazebných míst).
- (3) Lokalisaci vazebného místa na úrovni orgánu, pletiv a buněk.

### 1. Metody extrakce, čištění a izolace VB

Metody používané pro extrakci a čištění rozpustných a na membrány vázaných VB se částečně liší. Obecně se jedná o standardní postupy pro izolaci a čištění bílkovin.

1.1. **Rozpustné VB** jsou extrahovány po homogenisaci rostlinného materiálu v pufrech o vhodné molaritě a pH (většinou 0.01-0.1 M, pH 5-7). V průběhu izolace a purifikace je třeba potlačit aktivitu proteas s použitím vhodných inhibitorů (sojový inhibitor trypsinu aj.). Pro čištění supernatantu se osvědčila iontově výměnná sloupcová chromatografie a afinitní chromatografie s použitím derivátů fytohormonů a protilátek jako afinantů a agarosy jako pevného nosiče. Pro izolaci glykoproteinů je velmi účinná chromatografie na sloupci imobilisovaného concanavalinu A. Pro hodnocení homogenity a čistoty je používána elektroforéza nativního a denaturovaného preparátu na polyakrylamidu. Pro jednotlivé VB lze použít specifických metod, jako např. precipitace proteinů v kyselém prostředí (Brinegar et al. 1985).

1.2. **Membránové VB.** Prvním krokem v izolaci VB tvořících součásti buněčných membrán je podobně jako u rozpustných VB homogenisace rostlinného materiálu - ultrazvukem nebo klasicky ve třecí misce tloučkem. Ve srovnání s rozpustnými VB se zpravidla používají pufrы o nižší molaritě (0,01-0,05 M) a vyšším pH (okolo 8). Dalším krokem je rozdělení hrubého homogenátu diferenciací centrifugací a

\*Oba autoři se na přípravě příspěvku podíleli stejně.

následné zpracování peletů resp. supernatantů odpovídajících žádané buněčné frakci. K precisnějšímu rozdělení těchto frakcí lze použít centrifugaci gradientovou nebo metody rozdělovací (např. dělení ve dvou fázích “two-phase separation”). Podle dalších požadavků se lze dále soustředit buď na práci s částečně zachovanými membránami (např. vesikly plasmatické membrány), nebo získané preparáty solubilisovat a dále s nimi pracovat jako s rozpustnými VB.

Metody extrakce a čištění rozpustných i membránových VB budou demonstrovány na příkladech VB pro cytokininy a auxiny.

## 2. Biochemická charakterisace VB

Pro stanovení molekulové hmotnosti nativního VB se osvědčila sloupcová chromatografie na molekulárních sítěch (gelech) typu Sephacrylu s použitím molekulárních standardů. Při detekci VB v elučním profilu chromatogramu pomocí vazebného testu lze molekulovou hmotnost VB stanovit i u méně čistých preparátů. V aktivních frakcích lze určit molekulovou hmotnost podjednotek po denuraci proteinu pomocí PAGE. Glykosylace proteinu může být stanovena na základě jeho chování vůči concanavalinu A. K detekci vlastního vazebného místa v molekule VB lze použít fotoafinitního značení proteinu pomocí radioaktivně značeného derivátu fytohormonu modifikovaného navázáním fotoreaktivní azidoskupiny v místech, která neinterferují s vazbou hormonu na VB. Po osvětlení kovalentně navázaný ligand může být snadno detekován na základě radioaktivity jak na úrovni celistvé molekuly nativní VB, tak na úrovni vazebného místa odštěpeného působením specifických proteas (Brinegar et al. 1988). Fotoafinitně značených proteolytických štěpů VB lze použít pro stanovení sekvence aminokyselin, již může být dále využito pro (1) stanovení sekundární struktury vazebného místa, (2) určení klíčových strukturálních faktorů rozhodujících o vazbě a orientaci ligandu a tím následně určujících i specifitu vazebného místa (s pomocí molekulárního modelování, např. Fox 1992) a pro (3) konstrukci sond pro izolaci cDNA kódující VB (např. Hesse et al. 1989).

Pro charakterisaci kinetických parametrů VB je využívána řada vazebných testů založených na *in vitro* vazbě značeného ligandu o vysoké molární radioaktivitě; tyto testy umožňují stanovení poměru vázaného a volného ligandu a tím vymezení tzv. “specifické” a “nespecifické” vazby fytohormonu na základě výměnných reakcí při jeho přebytku. Tyto tzv. přímé vazebné testy jsou založeny na reversibilitě vazby a vzájemně se liší způsobem oddělení volného a na VB vázaného ligandu. Budou popsány a charakterisovány vazebné testy založené na (1) rovnovážné dialýze, (2) precipitaci VB síranem amonným po navázání ligandu (pro rozpustné a solubilisované VB), (3) ultrafiltraci a (4) centrifugaci. Těmito testy lze stanovit kapacitu VB, počet vazebných míst v molekule VB nebo hmotnostní jednotce VB, afinitu VB k fytohormonu a jeho derivátům a následně specifitu VB. Účinnost, spolehlivost a přesnost jednotlivých testů lze dobře hodnotit pomocí VB pro cytokininy (CBF-1), kterou lze izolovat v dostatečném množství a čistotě z obilí pšenice (Kamínek a Fox 1990).

## 3. Lokalizace VB.

Lokalisace VB může být studována na různých úrovních: v rámci celé rostliny, jednotlivých orgánů a pletiv i na úrovni vnitrobuněčné. Tomu odpovídá i spektrum používaných metod. Zatímco pro distribuci určité VB v rámci celé rostliny jsou zpravidla používány klasické přímé vazebné studie a “markerem” výskytu VB je její kapacita v jednotlivých částech rostliny (např. Walton a Ray 1981, Zažímalová a Kutáček 1985, Zažímalová et al. 1997), jsou pro lokalisaci konkrétních VB v pletivech či subcelulárních strukturách používány přístupy imuno-cytochemické (Brinegar 1994, Henderson et al. 1997).

**Poděkování:** Některé z výše uvedených metod byly vypracovány a optimalisovány v rámci řešení projektů 206/96/1032 Grantové agentury ČR a A6038706 Grantové agentury AVČR.

## Literatura:

- Assmann, S.M.: Ins and outs of guard cell ABA receptors. - *The Plant Cell* 6: 1187-1189, 1994.
- Barbier-Brygoo, H.: Tracking auxin receptors using functional approaches. - *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 1-25, 1994.
- Brinegar, C.: Cytokinin binding proteins and receptors. - In: *Cytokinins. Chemistry, Activity and Function.* (D.W.S. Mok, M.C. Mok, eds.). Pp. 217-232, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Brinegar, A.C., Stevens, A., Fox, J.E.: Biosynthesis and degradation of wheat embryo cytokinin-binding protein during embryogenesis and germination. - *Plant Physiol.* 79: 706-710, 1985.
- Brinegar, A.C., Cooper, G., Stevens, A., Hauer, C., Shabanovitz, J., Hunt, D.F., Fox, J.E.: Characterisation of a benzyladenine binding site peptide isolated from a wheat cytokinin-binding protein: sequence analysis and identification of a single affinity-labelled histidine residue by mass spectrometry. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5927-5931, 1988.
- Fox, J.E.: Molecular modeling of cytokinins and the CBF-1 receptor. - In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants.* (M. Kamínek, D.W.S. Mok, E. Zažímalová, eds.). Pp. 127-132, SPB Academic Publishing bv., The Hague, 1992.
- Harpham, N.V.J., Berry, A.W., Holland, M.G., Moshkov, I.E., Smith, A.R., Hall, M.A.: Ethylene binding sites in higher plants. - *Plant Growth Regul.* 18: 71-77, 1996.
- Henderson, J., Baulry, J.M., Ashford, D.A., Oliver, S.C., Hawes, C.R., Lazarus, C.M., Venis, M.A., Napier, R.M.: Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. - *Planta* 202: 313-323, 1997.
- Hesse, T., Feldwisch, J., Balshüsemann, Bauw, G., Puype, M., Vaderkerckhove, J., Löbler, M., Klämbt, D., Shell, J., Palme, K.: Molecular cloning and structural analysis of gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. - *EMBO J.* 8: 2453-2461, 1989.
- Jones, A.M.: Auxin-binding proteins. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 393-420, 1994.
- Kamínek, M., Fox, J.E.: Comparison of the sensitivity and reliability of cytokinin-binding assays using highly purified soluble binding protein. - In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants.* (M. Kamínek, D.W.S. Mok, E. Zažímalová, eds.). Pp. 461-467, SPB Academic Publishing bv., The Hague, 1992.
- Libbenga, K.R., Mennes, A.M.: Hormone binding and signal transduction. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (P.J. Davies, eds). Pp. 272-297, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995.
- Macdonald, H.: Auxin perception and signal transduction. - *Physiol. Plant.* 100: 423-430, 1997.
- Napier, R.M., Venis, M.A.: Auxin action and auxin-binding proteins. - *New Phytol.* 129: 167-201, 1995.
- Venis, M.A., Napier, R.M.: Auxin receptors and auxin binding proteins. - *Critical Rev. Plant Sci.* 14: 27-47, 1995.
- Walton, J.D., Ray, P.M.: Evidence for receptor function of auxin binding sites in maize - red light inhibition of mesocotyl elongation and auxin binding. - *Plant Physiol.* 68: 1334-1338, 1981.
- Zažímalová, E., Kutáček, M.: In vitro binding of auxin to particulate fractions from the shoots of dark-grown wheat seedlings. - *Plant Growth Regul.* 3: 15-26, 1985.
- Zažímalová, E., Březinová, A., Petrášek, J.: Putative auxin receptors and their possible role in plant development. - *Acta Universitatis Carolinae Biologica* 41: 259-272, 1997.

## Stanovení kyseliny abscisové RIA metodou

Klemš, M., Balla, J., Flores-Solís, J., Procházka, S.

Ústav botaniky a fyziologie rostlin, AF MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno  
tel: 05/45133296, e-mail: klems@dahlia.vszbr.cz

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon regulující v rostlinách vývojové a metabolické procesy abscise a dormance. Důležitou regulační funkci má kyselina abscisová i při zvýšení své endogenní hladiny v rostlinách za stresových podmínek, sucha, chladu, nevhodných osmotických podmínek a imisí. V explantátových kulturách je zkoumána její role v somatické embryogenezi. V rostlinách se ABA vyskytuje v nepatrných množstvích 10 - 50 ng/g čerstvé hmotnosti.

Chemicky je kyselina abscisová seskviterpen a v rostlinách vzniká z kyseliny mevalonové a z karotenoidů. Má 2 optické izomery, přičemž v rostlinách se vyskytuje jen (+)-(S)-enantiomer. Chemicky vyrobená (-)-(R)-ABA tvoří racemickou směs. Geometrická izomerie molekuly ABA eliminuje fyziologickou aktivitu ABA v případě, že karboxylová skupina je v *trans* konfiguraci.

Pro analytické stanovení je ABA extrahována z rostlinného materiálu vytřepáním homogenátu do vodného roztoku po dobu 24 hodin při +4°C. Volná ABA se oddělí centrifugací - zůstává v supernatantu. Do analýzy se ze vzorku odebírá 2 x 50 ml supernatantu.

Radioimunoanalytické stanovení (RIA) kyseliny abscisové je vysoce citlivá kvantitativní (detekční limit ABA v pg) imunochemická metoda stanovení ABA využívající schopnosti rozpoznání molekuly ABA protilátkou MAC 252 (QUARRIE et al. 1988) s velmi vysokou specifitou. Princip metody spočívá v kompetici nativní nebo standardní ABA (hapten) a radioaktivně značené <sup>3</sup>H-ABA (radioligand) ve vazbě na protilátku MAC 252. Za předpokladu konstantního množství protilátky MAC 252 a radioaktivně značené <sup>3</sup>H-ABA a přebytku nativní ABA, dochází k vytěsňování radioligandu z vazby s protilátkou a k vazbě haptenu s protilátkou. Tvorby komplexů hapten-protilátka a hapten-radioligand je dosaženo po inkubaci za nízké teploty (+4°C). Jejich separace je provedena vysrážením v síranu amonném a oddělením následnou centrifugací. Radioaktivita sedimentu je měřena technikou kapalné scintilace na scintilačním spektrofotometru Packard 2000 CA. Kalibrační křivka je sestrojena za použití standardní ABA (+/- *cis,trans*-ABA, Sigma).

ÚBFR pomocí radioimunoanalytického stanovení ABA studuje dynamiku endogenního obsahu ABA v průběhu dormance sladovnického ječmene, při indukci chladuvzdornosti ozimého ječmene jako markeru snížené teploty a při studiu dynamiky endogenní ABA v procesu somatické embryogeneze v *in vitro* kulturách.

### **Klíčová slova**

kyselina abscisová, radioimunoanalýza, hapten, radioligand, monoklonální protilátka

### **Příloha**

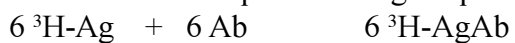
#### komponenty radioimunoanalýzy:

- monoklonální protilátka MAC 252 (Cambridge)
- radioligand (<sup>3</sup>H-ABA, Amersham)
- standart (hapten, +/- *cis,trans*-ABA, Sigma)
- extrahovaná volná ABA z rostlinného materiálu (hapten)



schéma precipitace (symboly):

tvorba komplexu radioligand-protilátka



tvorba obou typů komplexů



Literatura:

QUARRIE, S. A., WHITFORD, P. N., APPLEFORD, N. E. J., WANG, T. J., COOK, S. K., HENSON, L. E. and LOVEYS, B. R. (1988): A monoclonal antibody to (S)-abscisic acid: its characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscisic acid in crude extracts of cereal and lupin leaves. *Planta* 183, 330-339.

# Metody analýzy fotosyntetických pigmentů v jehlicích smrku ztepilého *Picea abies* (L.)KARST.

Krpeš, V.

Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, Bráfova 7, 702 00 Ostrava,  
e-mail: krpes.kbio@prfl.osu.cz

## 1. Metoda extrakce fotosyntetických pigmentů

Veškeré práce a manipulace se vzorky jsou prováděny při zeleném světle vlnové délky v rozpětí 510-530 nm. K 200 mg jehlic zbavených listových polštářků a řapíků se přidá 5 ml bezvodého acetonu a na vodní lázni se zahřívá na bod varu acetonu (60° C) po dobu 1 minuty. Potom následuje ochlazení v ledové tříšti a uchování ve tmě a chladu do dalšího zpracování.

Homogenizace se provádí s přidáním Mg CO<sub>3</sub> a křemenné drtě (zrno 0,3 mm). Po dokonalém rozmělnění se homogenát extrahuje 5x5 ml acetonem. Jednotlivé extrakty se shromažďují do dělicí nálevky. Po přidání petroléru a protřepání 25 ml nasyceného roztoku Na Cl následuje další protřepání a oddělení vodní vrstvy s nečistotami a vysokomolekulárními látkami, které by zkreslovaly měření a TLC analýzu. Epifázický roztok obsahující pigmenty se třikrát promyje destilovanou vodou a převádí se kvantitativně do vakuového odpařovačku. Odpařováno ve vakuu na 22° C v teplé vodní lázni do sucha. Suchý odparek se rozpuští v 1 ml bezvodého acetonu. Extrakce pro HPLC analýzu pigmentů se provádí bez promývání a zahušťování přímo do 100 % čistého acetonu.

## 2. Spektrofotometrické stanovení směsi

Při spektrofotometrickém stanovení směsi chlorofylových pigmentů se jejich absorpční křivky překrývají v rozsahu absorbance, kde platí LAMBERTŮV-BEERŮV zákon vyjadřující závislost absorbance světla při průchodu tloušťkou homogenní látky.

Ke stanovení obsahu chlorofylu *a* a *b* a celkových karotenoidů se používá jejich extrakt ve 100 % acetonu. Ten se zpracovává jako trojkomponentní systém na spektrofotometru Zeiss-Jena. K vyhodnocení jsou použity matematické vztahy odvozené VERNONEM (1960), jak je uvádějí LICHTENTHALER a WELLBURN (1983). Získané hodnoty se přepočítávají na 1 g suché hmotnosti. Rovnice pro výpočet chlorofylu jsou rovněž používány v pracích zabývajících se fotosyntetickou tematikou (ZVOLSKÝ, 1986). Zpřesnění výpočtových vztahů k stanovení fotosyntetických pigmentů provedl LICHTENTHALER (1987) a následně PORRA a kol. (1989), kteří také určili nové extinkční koeficienty pro chlorofyl *a* a *b* ve čtyřech různých rozpouštědlech. Upravené rovnice pro výpočet koncentrace chlorofylů v 80 % acetonu (mg. ml<sup>-1</sup>). vypadá následovně:

$$\begin{aligned} \text{Chl}a &= 12,25A_{663,6} - 2,55A_{646,6} \\ \text{Chl}b &= 20,31A_{646,6} - 4,91A_{663,6} \end{aligned}$$

## 3. Metoda tenkovrstvé chromatografie a zpětná eluce

Pro identifikaci fotosyntetických pigmentů a pro kvantitativní analýzu je používána rychlá a jednoduchá metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Největší předností této techniky je její tvárnost, což v mnoha případech umožňuje rychlé vyřešení analytického problému a nalezení optimálních podmínek pro kapalinovou sloupcovou chromatografii. Směs fotosyntetických pigmentů je pro svou složitost nevhodná pro jakékoliv přímé analýzy. Pro kvalitní rozdělení detekovaných pigmentů z analyzovaných asimilačních orgánů je zapotřebí takového absorbendu a takových organických rozpouštědel, aby došlo

k dokonale vyvinutým skvrnám (bez závojų). Fotosyntetické pigmenty se dělí na silikagelu, který je nanesen pomocí vhodného neutrálního pojidla na hliníkových deskách (Silufolu UV 254). Nejlépe se osvědčila vyvíjecí směs ve složení 5d. petroleter - 2d. aceton - 2,5d. éter. Pásky jednotlivých barviv byly eluovány příslušnými elučními činidly způsobem jak jej uvádí ERDELSKÝ, FRIČ (1979). b-karoten je eluován *n*-hexanem, chlorofyly a feofytiny acetonem, lutein, violaxantin, zeaxantin a neoxantin alkoholem.

Pro spektrální měření se používá absorpčního spektrofotometru. Hodnoty koncentrací jsou vypočítávány podle příslušných specifických koeficientů absorbance. Identifikace jednotlivých pigmentů je prováděna na přístroji PU 8800 a SPECORD M40. Dále je sledován charakteristický průběh křivek a příslušná maxima absorbancí. Kvantita pigmentů se stanoví podle matematických vztahů odvozených MACKINNEYEM, SMAKULOU in ERDELSKÝ a FRIČ (1979). Výsledky jednotlivých pigmentů se získávají tak, že hodnota absorbance *A* daného pigmentu se dosazuje do příslušného vztahu. Následuje výpočet množství pigmentu nalézajícího se ve 2 cm<sup>3</sup> květě spektrometru a přepočet na 1 g suchého materiálu (jehlic).

#### 4. Kapalinová chromatografie (HPLC)

Zavedení HPLC metody pro stanovení zejména xantofylů je velmi citlivým postupem zpřesňující analytickou část studia fotosyntetických pigmentů. Pigmenty se analyzují na přístroji tsp 3200 SPECTRA SERIES P100 s detektorem Chanel 3. Pro jejich rozlišení se provádí separace na koloně NUCLEOSIL 120-5C18 (4 x 150 mm) s použitím gradientové mobilní fáze A aceton-voda (80 : 20), fáze B aceton s UV detekcí při 440 nm. Obsah pigmentů je vypočítáván z jednotlivých píků v pořadí jak uvádí BRAUMANN a GRIMME (1979): neoxantin neo A, neoxantin, anteraxantin, violaxantin, violeoxantin, lutein, lutein-5,6-epoxid, chlorofyl *b*, chlorofyl *a'*, chlorofyl *a*, feofytin, b-karoten.

#### 5. Odběr vzorků

Zvláštní pozornost je třeba věnovat odběru asimilačních orgánů. V úvahu přichází:

- ◆ určení gradientu poškození odběrového materiálu
- ◆ expozice koruny s rozlišením na jižní (prosluněnou) a severní část
- ◆ určení doby odběru v denním režimu (vzhledem k fotosyntetické aktivitě)
- ◆ uchování odběrového materiálu, po tepelné inaktivaci enzymů
- ◆ podrobná charakteristika biotopu.

#### 6. Program kauzálních závislostí

K vyhodnocení výsledků analýz je používán grafický program kauzálních závislostí naměřených hodnot koncentrací a klimatických podmínek včetně škodlivin SO<sub>2</sub> a tuhých znečišťujících látek. Program podává operativní informace o stavu a sezonním průběhu změn fotosyntetických pigmentů sledovaných populací pokusných smrků a jejich závislosti na abiotických podmínkách. Program má dvě části:

- ◆ Zpracování a výpočet koncentrací fotosyntetických pigmentů a jejich vzájemných poměrů
- ◆ Grafické vyhodnocení fotosyntetických pigmentů v závislosti na abiotických podmínkách

#### Souhrn

Asimilační orgány smrku obsahují mnoho sekundárních metabolitů, což způsobuje analytické problémy při stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů, zejména při screeningovém vyšetřování metodou TLC. Proto je nutné věnovat maximální pozornost při čištění extraktů. Analýza metodou

HPLC podává přesnější obraz o kvalitativním zastoupení jednotlivých fotosyntetických pigmentů, stále je problematická identifikace piků xantofylové řady a dalších deepoxidantů. Metoda má význam při diagnostice poškození lesních porostů antropogenní činností.

Literatura:

- Braumann T, Grimme LH** 1979. Single-step separation and identification of photosynthetic pigments by HPLC. -*J.Chromatogr.* **170**, 264-268
- Erdelský K, Frič K** 1979. Praktikum a analytické metody vo fyziológii rastlín. SPN Bratislava
- Krpeš V**, 1990. Vývoj fotosyntetických pigmentů. In: Dynamika změn vybraných charakteristik lesních ekosystémů pod vlivem průmyslových emisí a vápnění půdy. - Závěrečná výzkumná zpráva SPZV VI-5-3/05, 10-105
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR** 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. - *Biochemical Society Transactions* **603**, 591-592
- Lichtenthaler HK** 1987. Chlorophylls and Carotenoids (34), Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*. - Acad. Press. **148**, 351-382
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. - *Biochim. Biophys. Acta* **975**(3), 384-394
- Vernon LP** 1960. Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. - *Anal.Chem.* **32**, 1144-1150
- Zvolský Jiří, Zvolský Jakub** 1986. Stanovení rostlinných pigmentů a jejich degradantů. - *Acta.Fac.paedag. Ostrava* **98**, 9-22

# Metody stanovení rostlinných hormonů

Macháčková, I.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Ke dvoru 15, 166 30 Praha 6  
tel: 02/36 81 56, fax: 02/36 81 59, e-mail: i.machackova@ueb.cas.cz

Metody stanovení rostlinných hormonů zaznamenaly v průběhu posledních dvou desetiletí významný rozvoj. Dříve byla většina stanovení prováděna biotesty, které jsou ve velké většině případů vysoce citlivé, ale jejich specifita není dostatečná. Dnes se převážně používají vysoce specifické a citlivé metody fyzikální či fyzikálně-chemické, jako jsou plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (GC, HPLC), nejlépe s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS, LC/MS) a metody imunochemické.

## 1. Odběr materiálu

*Co je potřeba v laboratoři?* Kapalný dusík, příp. suchý led, termosky, mrazicí pult na  $-70^{\circ}\text{C}$ , příp. lyofilizace

*Obecné zásady.* Pokud nezpracováváme materiál ihned, pak jej uchováváme v mrazicím pultu při  $-70^{\circ}\text{C}$ . Trvá-li odběr materiálu déle, je nutné již odebraný materiál držet v kapalném dusíku. Je-li odbíraný materiál vlhký, je třeba jej v nejvyšší možné míře osušit. Případný transport materiálu musí probíhat v suchém ledu, nebo lze materiál lyofilizovat a uchovávat a transportovat lyofilizovaný, v nádobě či sáčku se silikagelem, který jímá vzdušnou vlhkost. Materiál k analýzám nesmí nikdy rozmrznout!

Je třeba věnovat pozornost denní době odběru materiálu. Hladina hormonů se v průběhu denního cyklu může výrazně měnit, a proto při déletrvajících pokusech či při opakování pokusů je třeba materiál odbírat vždy ve stejnou denní dobu.

## 2. Extrakce a čištění extraktů

*Co je potřeba v laboratoři?* Kapalný dusík, třecí misky, u starších metod dělicí nálevky, vakuová odparka, případně Speed-Vac, rozpouštědla (metanol, aceton, etanol, éter-viz dále), radioaktivní (či deuterovaný) standard na sledování výtěžnosti, chromatografické kolony, Polyclar AT (nerozpustný polyvinylpyrolidon), iontoměničové materiály, Sep-Paky nebo podobné kolony s C-18 materiálem, desky na tenkovrstevnou chromatografii, scintilační počítač

*Postup- obecné zásady* Rostlinné hormony jsou organické látky snadno rozpustné v polárních rozpouštědlech. Vyskytují se však v pletivech ve stopových množstvích a před vlastním stanovením je musíme nahromadit a extrakt zbavit interferujících látek, na které jsou rostlinná pletiva velmi bohatá (barviva, fenolické látky apod.). Při extrakci musíme okamžitě s co nejvyšší účinností omezit enzymové aktivity (výběrem rozpouštědla, antioxidanty, nízkou teplotou). Před extrakcí provádíme pro zvýšení účinnosti homogenizaci. Jediným univerzálním způsobem homogenizace rostlinných pletiv je rozetření ve třecí misce po zmrazení kapalným dusíkem. Extrakční činidla, nejčastěji vodný (70-80%) metanol, etanol či aceton, užíváme 1-2krát destilovaná a vychlazená; extrakci 1-2krát opakujeme. Do rozpouštědla přidáváme antioxidanty, např. butylhydroxytoluen (BHT), dithiotreitol (DTT), merkaptoetanol či dietyldithiokarbamát (DIECA). Po extrakci rozpouštědlo odpaříme za sníženého tlaku a vodnou fázi dále čistíme. Ke zjištění ztrát v průběhu extrakce a čištění přidáváme na začátku extrakčního postupu izotopy značený interní standard, což je absolutní nutnost, neboť v různých extraktech se hormony různě rychle rozkládají. K čištění extraktů se používá s výhodou různých chromatografických technik: chromatografie papírová a tenkovrstevná (dnes spíše již jen k dělení metabolitů - nevýhodou tenkovrstevné chromatografie bývá nízká výtěžnost) a sloupcové chromatografie na různých nosičích. Nejčastěji se užívají různé Sephadexy a materiály iontoměničové. K odstranění fenolických látek je nejvhodnější Polyclar AT (je třeba najít podmínky, kdy se neváže i hormon). Vůbec

nejčastěji se dnes používají kolonky s C-18 materiálem typu Sep-Pak, na kterých volbou pH a rozpouštědla lze dosáhnout vysokého přečištění. Starší metody využívaly u hormonů, které jsou organické kyseliny (IAA, ABA, gibbereliny), vytřepávání z vodného roztoku do organického rozpouštědla (nejčastěji éteru) při různé hodnotě pH. K minimalizaci ztrát se doporučuje silylovat používané sklo a s výjimkou posledního kroku před stanovením neodpařovat extrakt do sucha.

**Zvláštnosti jednotlivých hormonů.** Indolové sloučeniny, zejména kyselina indolyl-3-octová (IAA), jsou dosti nestálé. Při jejich extrakci a čištění extraktu je třeba postupovat velmi opatrně (nízká teplota, antioxidanty) a navíc zamezit v nejvyšší možné míře přístupu světla, které vyvolává rozklad IAA. Gibbereliny jsou labilní při extrémních hodnotách pH a teplotách a je proto nutné pracovat v rozmezí pH 2,5-8,5 a při teplotě do 40 °C. Při manipulaci s extrakty ABA je třeba vyvarovat se zdrojů záření obsahujících silnější složku UV, neboť toto záření izomerizuje přirozeně se vyskytující *cis*-ABA na její *trans*-izomer. Při práci s glukózoesterem ABA nelze použít alkalické prostředí. U cytokininů nacházíme v pletivech volné báze, ribozidy, ribotidy a konjugáty, zejména glukozidy. Ribotidy lze převést na ribozidy působením fosfatázy (lépe je použít fosfatázu alkalickou). Chceme-li zamezit působení endogenních nespecifických fosfatáz, provádíme extrakci ve směsi metanol:chloroform:7N kyselina mravenčí (12:5:5, v/v) (tzv. roztok Bieleškého). K hydrolyze glukozidů a ribozidů se doporučují enzymatické metody. Příklad purifikačního postupu (včetně chromatografických technik) je na obr. 1. U etylénu ve většině sledování měříme pouze etylén vydávaný do atmosféry - rostliny po nějakou dobu inkubujeme v uzavřeném prostoru a z něj přímo odebíráme vzorek k analýze. Chceme-li znát obsah etylénu v mezibuněčných prostorech, provádíme extrakci v nasyceném roztoku síranu amonného za sníženého tlaku. Často místo etylénu měříme hladiny jeho prekurzoru kyseliny aminocyklopropankarboxylové (ACC) a jeho konjugátu (N-malonyl-ACC, MACC). MACC lze převést na ACC kyselou hydrolyzou a ACC stanovujeme jako etylén po oxidaci chlormanem či bromnanem sodným v alkalickém prostředí.

### 3. Biotesty

Biotesty využívají snadno kvantifikovatelné růstové či metabolické odezvy na daný hormon. Jejich využití vděčíme za objev většiny růstových regulátorů. Jejich výhodou je jednoduchost, dostupnost i vysoká citlivost (detekční limit bývá  $10^{-7}$  -  $10^{-10}$  mol.l<sup>-1</sup>), nevýhodou pak nízká specifita a interakce s dalšími látkami v extraktech. Přes nesporné výhody exaktních fyzikálních a fyzikálně-chemických metod zůstanou biotesty neocenitelným pomocníkem pro první orientaci. Nenahraditelné jsou pak při hledání nových regulátorů růstu. Většina auxinových biotestů je založena na schopnosti auxinů stimulovat dlouhivý růst, např. u segmentů koleoptilů ovesa nebo pšenice, stonků hrachu a hypokotylů okurky. Gibberelinové biotesty využívají většinou zakrslé mutanty rýže, kukuřice či hrachu s nedostatečnou syntézou gibberelinů, u kterých měříme intenzitu dlouhivého růstu po aplikaci gibberelinů. Využívá se také schopnosti gibberelinů zvyšovat syntézu a sekreci  $\alpha$ -amylázy v obilkách ječmene při klíčení. Pro stanovení cytokininů biotesty se nejvíce využívá jejich schopnosti brzdit stárnutí (rozklad chlorofylu v segmentech listů) či aktivovat buněčné dělení (v *in vitro* systémech např. u kalusů tabáku a sóji nebo explantátů mrkve). Často se používá tzv. amarantový test, který využívá schopnosti cytokininů stimulovat v klíčících rostlinách *Amaranthus caudatus* tvorbu červenofialového pigmentu amarantinu. Biotesty na kyselinu abscisovou využívají uzavření průduchů v segmentech listů nebo inhibici růstu segmentů koleoptilů ovesa a pšenice. Pro snadnost stanovení etylénu plynovou chromatografií se biotesty v podstatě neužívají.

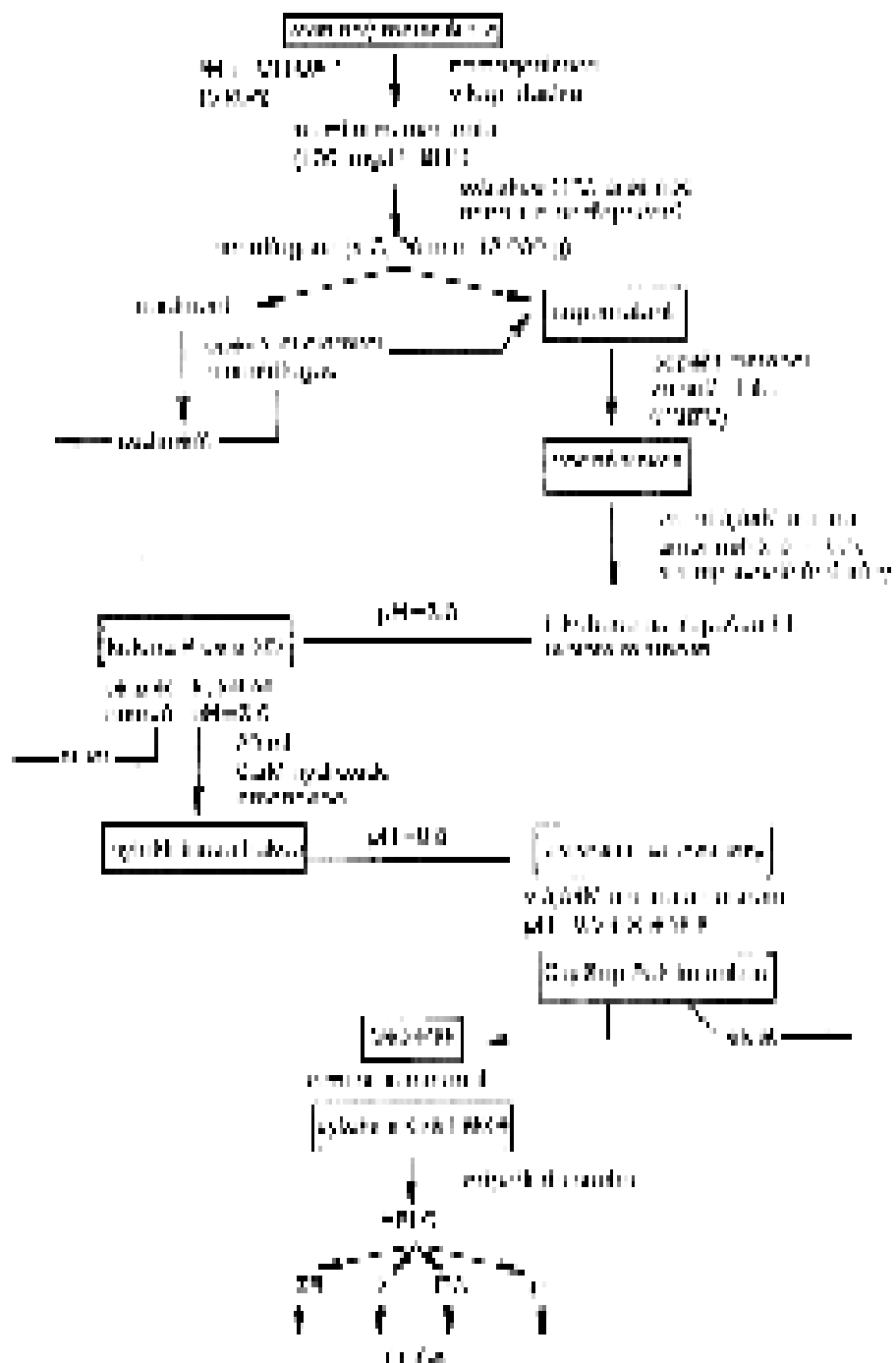
### 4. Metody stanovení

*Co je potřeba v laboratoři?* Plynový chromatograf, kapalinový chromatograf, ELISA reader, případně scintilační počítač

**Obecné zásady.** K finálnímu stanovení fytohormonů lze použít plynové či kapalinové chromatografie nebo metod imunochemických. Plynovou chromatografií lze stanovit látky plynné a takové, které lze bez rozkladu za normálního tlaku převést do plynné fáze. Proto se stálé látky před stanovením převádějí na těkavější deriváty, např. trimetylsilylderiváty. Detekci provádíme ionizací látek za vysoké teploty (plamenově ionizační detektor, FID) nebo zářením (fotoionizační detektor, PID), na základě rozdílu

teplot (TCD), vychytáváním elektronů emitovaných izotopem  $^{63}\text{Ni}$  (ECD) a analýzou molekulárních iontů fokusovaných a urychlovaných v elektrickém nebo magnetickém poli (hmotová spektrometrie, MS). Známe i detektor specifický pro látky obsahující dusík a fosfor (NPD). Plynová chromatografie je využívána zejména pro stanovení etylénu a kyseliny abscisové. Daleko širšího použití dosahuje kapalinová chromatografie (HPLC). Kolony obsahují nejčastěji silikagelovou matrix s navázanými  $\text{C}_8$  nebo  $\text{C}_{18}$  uhlovodíkovými zbytky, tedy vysoce hydrofobní materiál. Jsou k dispozici i náplně iontoměničové, chirální a hydrofilní. Detekujeme na základě absorbance v UV světle, fluorescence, redox potenciálu, optických vlastností, značení radioizotopy nebo hmotovou spektrometrií.

Imunochemické metody jsou založeny na vysoce specifické interakci antigen-protilátka. Stanovení lze provést dvěma způsoby: radioimunotestem (RIA) a enzymovým imunotestem (ELISA, EIA). Při radioimunotestu probíhá reakce v roztoku a je založena na vzájemném vytěšňování hormonu a jeho radioaktivně značeného analogu (traceru) z vazby na protilátku. V případě ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) jsou protilátky navázány na povrch jamek speciálních destiček a na ně se váže



hormon nebo jeho konjugát se snadno kolorimetricky stanovitelným enzymem (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza). Tyto testy jsou vysoce citlivé a specifické, ale je nutné, zejména pro ELISA test, použít vysoce přečištěné extrakty.

Literatura:

HEDDEN, P., 1993: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 107-129.

PROCHÁZKA, S., ŠEBÁNEK, J. et al. 1997. Regulátory růstu rostlin. Academia, Praha.

RIVIER, L., CROZIER, A. (eds.), 1987: Principles and Practice of Plant Hormone Analysis, Vol. 1 a 2, Academic Press, London.

SEMBDNER, G., SCHNEIDER, G., SCHREIBER, K., 1988, Methoden zur Pflanzenhormonanlyse, VEB G. Fischer Verlag, Jena.

YOKOTA, T., MUROFUSHI, N., TAKAHASHI, N., 1980: V Hormonal Regulation of Dvelopment. I. Molecular Aspects of Plant Hormones. Encycl. Plant Physiol., New Ser., Vol. 9 (ed. MACMILLAN, J.), Springer Verlag, Berlin.



## Elektroforetická analýza isoenzymů

Pospíšková, M., Vacková, K.

Výzkumný ústav okrasného zahradnictví, 252 43 Průhonice

tel: 02/67 75 00 38, fax: 02/67 75 00 23, e-mail: martin@mail.natur.cuni.cz

Isoenzymová analýza je moderní metoda používaná od 60. let v oblasti populační genetiky, vývojové biologie, taxonomie a nově i při šlechtění rostlin. Variabilita enzymů byla poprvé popsána koncem 50. let (Hunter a Markert, 1957; Markert a Moller, 1959). Isoenzymy jsou enzymy, které katalyzují stejnou reakci, ale liší se aminokyselinovým složením a svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi (při analýze využíváme jejich různou elektroforetickou pohyblivost). Po specifickém barvení dostaneme na gelu spektrum isoenzymů daného jedince. Nástin možných komplikací a problémů, které je nutno při definování isoenzymů i při samotné analýze brát v úvahu, uvádějí Hadačová a Ondřej (1972).

Elektroforéza je separační technika pro dělení směsi elektricky nabitých látek. Elektroforéza na gelu využívá rozdílů ve velikosti náboje dělených molekul (čím větší je náboj, tím rychleji se molekula pohybuje v elektrickém poli), gel může také fungovat jako molekulové síto a rychlost pohybu pak odpovídá i velikosti a tvaru molekuly. Náboj proteinu závisí na pH, při nízkém pH se ionizují bazické skupiny, molekula získá kladný náboj a poputuje v elektrickém poli ke katodě; při vyšším pH budou naopak disociovat kyselé skupiny, molekuly proteinu ponesou záporný náboj a budou se pohybovat směrem k anodě.

Elektroforéza probíhá v různých typech nosného media, pro dělení enzymů se většinou užívají škrobové a polyakrylamidové gely. U polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) lze snadno změnou koncentrace monomerů měnit porositu gelu v závislosti na velikosti dělených proteinů. Další předností PAGE je dobrá reprodukovatelnost gelů, lepší dělicí schopnost, krátký časový průběh elektroforézy a ostré proužky na gelu. Elektroforéza na škrobovém gelu (SGE) se užívá častěji tam, kde analyzujeme velký počet jedinců z hlediska několika různých enzymů. SGE nemá tak dobrou dělicí schopnost jako PAGE, její výhodou je ale netoxičita potřebných chemikálií (akrylamid je neurotoxin), nižší finanční náročnost, snadnost přípravy a nanášení. Škrobové gely lze horizontálně nařezat a každý řez použít pro stanovení jiného enzymu. Podrobný popis přípravy gelů lze nalézt v literatuře (Kirschner a kol. 1994, Shields a kol. 1983 a Wendel a Weeden 1989).

Kromě obvyklého vybavení laboratoře (přístroj na přípravu vody, váhy, pH metr, centrifuga, termostat, digestoř, mrazák, chladnička) je pro elektroforézu isoenzymů nezbytná elektroforetická jednotka s možností chlazení gelů, el. zdroj (1000V a 100mA) a termostatický cirkulátor vody. Elektroforéza bývá horizontální pro škrobové gely a vertikální pro gely polyakrylamidové, hlavně z důvodu odlišného způsobu odlévání gelů a manipulace s nimi. V naší laboratoři pracujeme s horizontální elektroforézou Multiphor II firmy Pharmacia, která umožňuje práci s oběma druhy gelů.

K analýze jsou vhodné jak vegetativní tkáně (mladé listy, listové pupeny, kořenové špičky, klíčící rostliny), tak tkáně generativní (pyl, části semen). Tkáň se rozdrtí a přidá se extrakční pufr, jehož složení se liší podle rostlinného druhu, druhu použité tkáně a obsahu interferujících látek v ní. Existující receptury (např. Wendel a Weeden, 1989) je nutné doladit empiricky. Extrakt je nutno udržovat stále v chladu (4°C), aby nedošlo k destrukci enzymů. Je možné ho uložit v mrazáku a uchovat delší dobu - několik týdnů (-20°C) nebo měsíců (-80°C). Pro analýzu v polyakrylamidovém gelu je extrakt nutné centrifugovat a supernatant pak nanášíme do jamek v gelu mikropipetou, u škrobového gelu tento krok odpadá, extrakt hned nasajeme do knotů z filtračního papíru a klademe do řezu v gelu. Pracovní postup popisují podrobně např. Kirschner a kol. (1994), Shields a kol. (1983) a Wendel a Weeden (1989).

Rozdělené isoenzymy vizualizujeme specifickým barvením, kdy detekce enzymů je založena na reakci, kterou enzym katalyzuje. V případě pozitivního barvení jde o srážení a změnu barvy původně

rozpuštěné indikační látky v místě enzymové aktivity - na bezbarvém gelu se vytvoří barevné proužky. Méně často se využívají metody negativního barvení založené na destrukci nebo inhibici tvorby barevných složek v místě aktivity enzymu, zatímco zbytek gelu je barevný. Návody pro barvení jednotlivých enzymů uvádí např. Vallejos (1983).

Po obarvení získáme gel s různě uspořádanými proužky - zymogram. Poloha a počet proužků závisí na typu organismu, jeho stáří, druhu použité tkáně a na tom, jaký enzym byl barven. Počet proužků je určen počtem genů kódujících daný enzym, jejich alelickým stavem (homozygotní nebo heterozygotní), kvartérní strukturou funkčního enzymu (složení z podjednotek) a lokalizací enzymu v různých kompartmentech buňky. Při hodnocení zymogramu předpokládáme, že rozdílná pohyblivost enzymu v elektrickém poli odráží přímo rozdíly v kódujících genech a exprese genů kódujících enzymy je kodominantní, tzn. v organismu jsou přítomny produkty všech alel daného lokusu (Kirschner a kol., 1994); dále předpokládáme, že následné úpravy produktů genů jinými enzymy neovlivňují polymorfismus daný změnami sekvencí DNA.

Pro efektivní zhodnocení získaných výsledků se doporučuje vyhodnotit dědičnost klasicky - analýzou vyštěpování vloh v potomstvu hybridu. Pokud je enzym kódován jen jedním genem v jednom lokusu, při křížení homozygotních rodičů s různými alelami daného genu vznikne F1 generace, jejíž genotyp je heterozygotní. V případě monomerního enzymu najdeme na gelu dva proužky, z nichž každý je produktem jedné alely daného lokusu, v případě dimeru se funkční enzym může skládat z podjednotek třemi různými způsoby a na gelu najdeme tři proužky (dva homodimerické a jeden heterodimerický), v případě trimeru čtyři atd. V F2 generaci se při křížení hybridů vyštěpují jednak původní rodičovské homozygotní fenotypy, jednak fenotypy heterozygotní. Pokud je enzym kódován ve více než jednom lokusu, je interpretace složitější. Může docházet ke vzniku intergenických heterodimerů (při kombinaci podjednotek vzniklých přepisem genů v různých lokusech), jejichž zóna aktivity leží mezi produkty obou lokusů. Výše uvedené platí pro diploidní organismy, u rostlin je poměrně často situace komplikovaná polyploidii. Někdy se vyskytnou tzv. nulové alely, což jsou alely s potlačenou či nulovou aktivitou, nebo se mohou objevit sekundární isoenzymy, vzniklé při posttranslačních úpravách produktů genů nebo degradací proteinů při laboratorním zpracování vzorků (Kirschner a kol., 1994).

Metoda je finančně (hlavně chemikálie pro barvení enzymů) i časově (elektroforéza běží až 6 hodin) dosti náročná.

#### Literatura:

- Hadačová, V. - Ondřej, M.: Izoenzymy. Biologické listy, 37, 1972: 1-25.
- Hunter, R. L. - Markert, C. L.: Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, 125, 1957: 1294-1295.
- Markert, C. L. - Moller, F.: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45, 1959: 753-763.
- Kirschner, J. - Kirschnerová, L. - Štěpánek, J. - Tichý, M.: Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin. Příručka praktických cvičení pro posluchače katedry botaniky Přírodovědecké fakulty UK, 1994. Průhonice.
- Shields, C. R. - Orton, T. J. - Stuber, C. W.: An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (Eds.), Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. 1983. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Vallejos, C. E.: Enzyme activity staining. In: S. D. Tanksley and T. J. Orton (Eds.), Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. 1983. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Wendel, J. F. - Weeden, N. F.: Visualization and interpretation of plant isozymes. In: D. E. Soltis and P. S. Soltis (Eds.), Isozymes in plant biology. 1989. Dioscorides Press, Portland, Oregon.

## Kapilární elektroforetické metody ve fytochemii a fyziologii rostlin

Snopek, J.

Katedra fyziologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Viničná 5, 128 44 Praha 2  
tel: 02/21 95 31 55 , fax: 02/21 95 33 06, e-mail: snopek@prfdec.natur.cuni.cz

V biochemii rostlin, fytochemii a v oborech s nimi souvisejícími se při řešení výzkumných úkolů setkáváme s problémy, které lze úspěšně studovat elektromigračními metodami. Kromě všeobecně známých aplikací těchto metod v "klasickém provedení" ke sledování a purifikaci bílkovin (enzymů, izoenzymů apod.) či nukleových kyselin, tedy především makromolekulárních látek, se dají využívat i novější varianty těchto metod prováděných v kapilárách k dělení podstatně širšího spektra sloučenin.

Pojem "kapilární" lze v oblasti separačních analytických metod považovat za synonymum pojmů "nový", "zdokonalený", "...se značně zvýšenou účinností".

Toto tvrzení lze dokumentovat na analytických kapilárních metodách dnes již ve světě široce využívaných, jako jsou kapilární plynová chromatografie, superkritická fluidní chromatografie i vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ve všech jejich modifikacích. Převedení separační metody do "kapilární" modifikace přináší zvýšení rozlišovací schopnosti i rychlosti této metody a značně redukuje potřebné množství dávkovaného vzorku při analýzách. Kapiláry o průměru desítek až stovek mikrometrů tvoří vysoce účinné stabilizační prostředí pro elektroforetické separace.

Kapilární elektroforéza (CE) (Hjerten, 1967; Jorgenson et al., 1981, 1981a) využívá kromě separačních mechanismů konvenčních elektroforetických metod ještě efektů, které přináší aplikace elektrického pole v prostředí kapilár. Toho je např. využíváno v modifikacích CE i k separacím látek, které nenesou vlastní náboj. Tato metoda nabízí rychlost, snadnost ovládání a možnost on-line kvantifikace i automatizace podobné vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC). Detekce je prováděna v průběhu analýzy, a tak odpadá časově náročný "barvicí krok" po vlastní separaci, známý z konvenčních elektroforetických metod. Výsledky analýz jsou získány řádově v minutách, u velmi složitých separací v několika desítkách minut. To opět favorizuje tyto metody při srovnání s konvenčními, které obvykle vyžadují nejméně hodiny i dny k získání konečných výsledků separací.

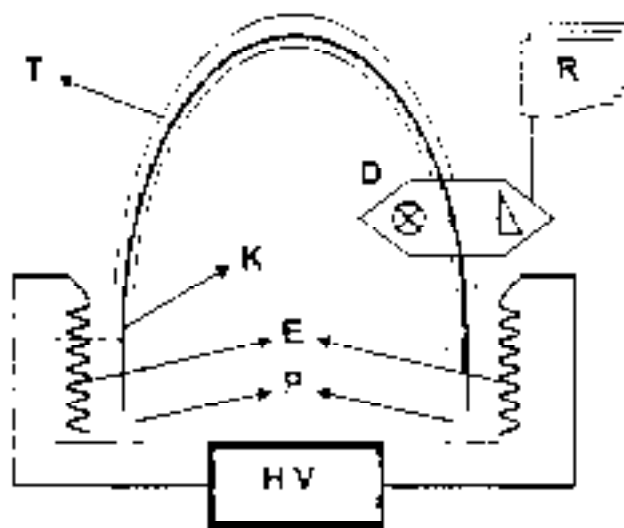
Metodami CE lze provádět většinu separací realizovatelných HPLC. Na rozdíl od ní vyžaduje pouze nanolitrové objemy dávkovaných vzorků, z čehož vyplývá, že je možné s typickým objemem vzorku potřebným pro jednu HPLC separaci provést stovky CE analýz. Další obrovskou výhodou, jak z hlediska metodického tak i ekonomického, oproti HPLC je obrovská flexibilita separační selektivity. Lze jí dosáhnout jednoduše pouhou změnou složení pufru použitého k dělení analytů v jednom typu kapiláry. Objem pufru může být i menší než 10 ml. Takto je možné provádět dělení látek založená na mnoha charakteristických vlastnostech analyzovaných molekul (např. velikosti, náboji, hydrofobity, ale i chiralitě). Stejně či podobné separace v případě HPLC vyžadují desetitisícové investice do speciálních chromatografických kolon.

Kapilárními elektroforetickými metodami lze dělit široké spektrum látek, zahrnující např. peptidy, proteiny, oligonukleotidy, aminokyseliny, vitamíny, organické kyseliny a báze, anorganické ionty, izomerní sloučeniny různých typů, včetně optických izomerů. Vzhledem k tomu, že CE metody nabízejí rozdílnou separační selektivitu, v případě analýz složitých směsí látek nebo při ověřování čistoty analyzovaných látek (např. při analýze léčiv), ji lze považovat za komplementární k HPLC (a naopak).

Schema instrumentace pro provádění CE separací je znázorněno na obrázku

č. 1. ; skládá se ze stabilizovaného zdroje napětí (obvykle 30 kV), detektoru (UV/VIS nebo Laserový det.), záznamového zařízení nebo počítače uzpůsobeného ke sběru dat,

dvou elektrodových nádobek naplněných vhodným pufrem, do kterých jsou ponořeny



**Obr.1** – Schema přístroje pro kapilární elektroforézu

( HV = zdroj vysokého napětí, 30 kV; P = nádoby s pufrem; E = Pt elektrody;  
K = kapilára; T = termostatování kapiláry; D = detektor; R = záznamové zařízení n. PC )

konce kapiláry ( obvykle i. d. 25 – 75 mm ), která může být ještě celá umístěna do temperovacího/chladicího bloku či obalu.

Molekuly jsou separovány na základě různé rychlosti migrace kapilárou plněnou vhodným pufrem, případně s dalšími aditivami upravujícími podmínky separace. Rozdělené komponenty vzorku jsou monitorovány detektorem, jak migrují malým segmentem kapiláry umístěným v detektoru. Detekční signál je zaznamenáván v podobě píků na elektroforeogramech, podobně jako na HPLC chromatogramech. Avšak na rozdíl od HPLC, kde všechny komponenty nadávkované směsi migrují průtokovou celou detektoru stejnou rychlostí, integrovaná plocha píků v případě elektroforeogramů je funkcí koncentrace analytu a migrační rychlosti.

V instrumentaci pro CE lze provádět několik typů separací. Nejjednodušší jsou separace prováděné v jednoduchých roztocích pufřů. Tento typ CE je nazýván kapilární zónová elektroforéza (CZE) a dala by se přirovnat k elučnímu módu HPLC.

Přidáme-li k základnímu elektrolytu vhodný lineární polymer nebo naplní-li se kapilára porézním gelem (např. polyakrylamidem) mohou se v tomto CE uspořádání provádět dělení např. nukleových kyselin na základě rozdílné velikosti molekul (“sieving effect“). Obvykle získáme stejná pořadí separovaných komponent vzorku jako při konvenční gelové elektroforéze.

Lze dokonce v CE provádět dělení látek metodou isoelektrické fokusace. Provádí se v kapilárách s chemicky modifikovaným vnitřním povrchem. Typická kapilární isoelektrická fokusace je provedena za méně jak 10 minut. Někdy však mohou nastat problémy při detekci separovaných zón.

Modifikace CE umožňující současná dělení aniontů, kationtů i neutrálních látek se nazývá micelární elektrokinetická chromatografie (MECC) (Terabe et al., 1984; 1985). Těchto dělení je dosahováno díky kombinaci elektroforetických migrací látek a jejich interakci s micelami tenzidů přidávaných do roztoků elektrolytů (o pH 1-7) v nadkritických micelárních koncentracích.

K limitním faktorům určujícím citlivost metody pro konkrétní separované analyty patří vlnová délka detektoru, koncentrace a extinkční koeficient vzorku, délka dávkování vzorku a aplikované elektrické pole při separaci (souvisí i s případným efektivním chlazením kapiláry). V případě biomolekul se obvykle připravuje několik mikrolitrů vzorku o koncentraci 5-50 mg/ml. Dávkovaný objem roztoku bývá 1-2 nl, a z toho plyne, že pouze několik pikogramů vzorku prochází detektorem. Extrémní citlivosti lze dosáhnout použitím detekce založené na přímé či nepřímé fluorescenci indukované lasery. Dnes je možná i on-line kombinace CE metody s hmotnostní spektrometrií. Tyto metody jsou ale poněkud finančně náročnější.

Do skupiny CE metod patří i kapilární izotachofóza (ITP) (Everaerts et al., 1976). Jedná se o elektroforetickou metodu, při níž se všechny nabitě molekuly pohybují v elektrickém poli stejnou (=iso) rychlostí (=tacho). Může být využita k separaci kationtů i aniontů, ale ne současně.

Princip metody spočívá v tom, že se nejbližší katody (při dělení kationtů; dále= K), či anody (při dělení aniontů; dále = A) umístí elektrolyt, jehož kation (K) či anion (A) má v celém systému nejvyšší elektroforetickou pohyblivost [tzv. "vodící ion"]. Naproti tomu u anody (K), či katody (A), se umístí elektrolyt s nejnižší pohyblivostí kationtu (K) či aniontu (A) [tzv. koncový ion"]. Oba ionty, vodící i koncový, mají stejný protion, který má významnou funkci pufrční. Je-li mezi uvedené elektrolyty (vodící a koncový), umístěn vzorek s intermediální pohyblivostí iontů, pak se tyto ionty seřadí podle své efektivní pohyblivosti od nejrychlejšího až po nejpomalejší. Šířka zón je úměrná celkovému množství příslušných iontů, ale lze ji ovlivnit koncentrací vedoucího iontu. Přestože se jedná především o analytickou metodu, lze ji využít i v preparativním měřítku, případně jako předseparační stupeň, před jinou CE metodou.

Na příkladech CE separací polohových izomerů methoxyfenyloctových kyselin a 3-indolylderivátů karboxylových kyselin (= auxin a strukturně příbuzné látky či metabolity) bude v přednášce demonstrována separační účinnost výše zmiňovaných metod a uvedeny i možnosti optimalizace dělení. Možnosti zjišťování optických čistot enantiomerů, patřící mezi nejobtížnější separační úkoly, budou prezentovány na příkladech ITP separací optických izomerů efedrinových alkaloidů a CE separacích enantiomerů chloramfenikolu. (Snopek et al. 1988, 1992, 1996).

#### Literatura:

- Everaerts F.M., Beckers J.L. & Verheggen Th.P.E.M.(1976): In *Isotachopheresis, The Journal of Chromatography Library*, Vol.6, Elsevier, Amsterdam.
- Hjerten S. (1967): Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.* 9, 122.
- Jorgenson J.W. & Lukacs K.D. (1981): *Anal. Chem.*, 53, 1298.
- Jorgenson J.W. & Lukacs K.D. (1981a): 218, 209.
- Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. & Ando T. (1984): *Anal. Chem.*, 56, 113.
- Terabe S., Otsuka K. & Ando T. (1985): *Anal. Chem.*, 57, 834.
- Snopek J., Smolková-Keulemansová E., Cserhádi T., Gahm K.H. & Stalcup A. (1996): In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Lehn J.-M. (Chr. Ed.), Vol.3, Pergamon, Elsevier Sci., Oxford, N. Y., Yushima, 515, a citace tam uvedené.
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E. (1988): *J.Chromatogr.*, 438, 211.
- Snopek J., Jelínek I., Smolková-Keulemansová E. (1992): *J.Chromatogr.*, 609, 1, a citace tam uvedené.

# Biochemické metody používané při studiu fotosyntézy

Sofrová, D.

Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, Albertov 2030, 128 43 Praha  
tel: 02/21 95 23 27, fax: 02/21 95 23 31, e-mail: photosyn@natur.cuni.cz

Předmětem studia biochemie fotosyntézy jsou děje na molekulární úrovni, které probíhají hlavně v chloroplastech, v tylakoidních membránách a jejich submembránových částicích. Biochemie fotosyntézy zahrnuje jednak pochody spojené s přenosem elektronů a protonů, včetně fotolýzy vody; výsledkem je tvorba ATP, NADPH a O<sub>2</sub>, jednak děje probíhající ve stromatu chloroplastů, obecně mimo tylakoidní membrány a to fixaci CO<sub>2</sub> a tvorbu sacharidů. (Následující příspěvek nebude vyčerpávajícím přehledem všech metod. Cílem je seznámit zájemce s běžnými, poměrně jednoduchými a dostupnými metodami.)

## Celé téma lze rozdělit na:

- I.** Izolace (chloroplastů, tylakoidních membrán, subtylakoidních částic, event. některých enzymů).
- II.** Fotochemické aktivity (fotosystému II /PS II/ a fotosystému I /PSI/).
- III.** Další identifikační postupy a ostatní metody.

### I. Izolace.

**1.** Podstata metody: rozrušení buněčných stěn, oddělení chloroplastů od ostatních částí buňky, získání chloroplastů s vysokou biologickou aktivitou.

**2.** Shrnutí základních postupů.

**A.** Homogenizační postupy, jako i používaná média jsou dosti různorodá. Homogenizace rostlinného pletiva obvykle mechanicky (třecí miska, homogenizátory). Homogenizační a resuspendační média "povinně" obsahují osmotikum (sacharidy, cukerné alkoholy, méně často NaCl), pufr (obvykle 5 a 100 mM, pH mezi 6,3 a 8,5), MgCl<sub>2</sub> (5 - 10mM). Další složky jsou věci názoru a "víry".

**B.** Pracovní postup. Homogenizace v příslušném médiu, rychlá a krátká centrifugace (do 2000xg, 60 sekund), resuspendace sedimentu, účinnější centrifugace (cca 2000xg, do 10 minut), konečná resuspendace.

**3.** Zhodnocení finanční a časové náročnosti.

Velmi nenáročné: jakákoliv běžná, i stolní, centrifuga, běžné chemikálie. Čas: max. 30 minut.

**4.** Úskalí metody: žádné.

Literatura:

D.A. Walker (1971): Methods Enzymol. 23, 211 - 220

J. Barthová, D. Sofrová, M. Tichá (1980): Základní praktikum z biochemie, SPN Praha, str. 171 - 179.

Izolace tylakoidních membrán z chloroplastů znamená resuspendaci v hypotonickém médiu a následnou centrifugaci.

Poznámka: Izolace tylakoidních membrán z jiných typů fotosyntetických organismů (bakterie, sinice) se od výše popsaného standardního postupu vhodného pro vyšší rostliny obsahující chloroplasty liší. Subtylakoidní částice, obvykle částice PS II a PS I, komplex cytochromů typu *b* a *f* či ATPsyntáza, vyžadují dezintegraci membrán a to nejčastěji tenzidy (detergenty). Nejvhodnější jsou: amfifilní tenzidy nebo tenzidy typu glykosidů.

Izolace rozpustných enzymů stromatu chloroplastů využívají běžných enzymologických postupů (dezintegrace pletiva, separace, čištění enzymu, enzymová aktivita, studium aktivního místa, regulační mechanismy).



## **Moderní metody hmotnostní spektrometrie (MS) a jejich uplatnění při studiu a analýze látek rostlinného původu**

Šimek, P.

Entomologický ústav AVČR, Laboratoř analytické chemie, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
tel: 038/777 52 86, fax: 038/436 25, e-mail: psimek@entu.cas.cz

---

V příspěvku je podán přehled současných metod hmotnostní spektrometrie a pracovišť v ČR, jež tuto techniku používají k analýze přírodních látek v rostlinných matricích. Pozornost bude zaměřena na nové způsoby ionizace biomolekul (ionizace za atmosferického tlaku, laserem) a na nové možnosti spojení metody MS se separačními technikami, zejména s kapalinovou chromatografií (LC/MS). Dále budou diskutovány principy, technické přednosti a omezení moderních hmotnostních spektrometrů z hlediska jejich využití v biochemické laboratoři. Zkušenosti s metodou MS budou doloženy aplikacemi z praxe Laboratoře analytické biochemie Entomologického ústavu a Laboratoře LC/MS Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

Literatura:

Application of Modern Mass Spectrometry in Plant Science Research.

Russell, P.N., Terence, J.W. (ed.), Clarendon Press, Oxford (1996)



## Izolace protoplastů, inokulace fytoviry a jejich imunodetekce

Šindelářová, M., Šindelář, L.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6,  
tel: 02/24 31 01 09, fax: 02/24 31 01 13, e-mail: elsindel@site.cas.cz.

**Podstata metod:** Podstata přípravy mesofylových protoplastů tabáku spočívá v enzymatické degradaci buněčné stěny a tím k uvolnění protoplastů. Jejich inokulace kompletním virionem TMV je založena na skutečnosti, že jak virus, tak plasmalema protoplastu mají záporný povrchový náboj. Proto se na virové částice naváže polykationt (poly-L-ornithin) a tento komplex se stejným mechanismem naváže na plasmalemu; virová částice pak prochází přes membránu pinocytosou. Stanovení obsahu viru v protoplastech a procenta infikovaných protoplastů je založeno na metodě ELISA, při které se na antigen (virus) naváže protilátka značená alkalickou fosfatou. Při použití vhodného substrátu se pak uvede do chodu specifická enzymová reakce, jejíž měřitelný barevný produkt odpovídá koncentraci enzymu a ta zase koncentraci antigenu (viru).

**Mesofylové protoplasty** připravujeme z listů tabáku o stáří 60 dní od vysetí, ze kterých vyřezáme mezi žilkami proužky šířky 1 mm. Proužky podrobíme plasmolyse při 25° C v 10 mM MES-KOH pufru o pH 5.5, který obsahuje 0.45 M manitol, 1 mM KNO<sub>3</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 nM KI a 0.1 nM CuSO<sub>4</sub> (CPW medium, [1]). Medium pak vyměníme za stejné obsahující 1 % (v/o) celulasy (Onozuka R-10, SERVA) a 0.25 % macerasy (Macerozyme R-10, SERVA) a vakuově infiltrujeme (na 1 g proužků používáme 10 ml media). Po 15 min při 30° C medium odlijeme, centrifugujeme 10 min při 2 000 g (odstranění většiny protoplastů houbového parenchymu) a znovu vrátíme k proužkům. Po 2 - 3 hod při 30° C odstraníme zbytky rostlinných pletiv filtrací přes nylonovou síťku 100 mm a protoplasty shromáždíme centrifugací (10 min 1 500 g). Protoplasty resuspendujeme v CPW mediu v kyvetách s úzkým hrdlem, přidáme stejný objem 1.4 M sacharosy v CPW mediu a centrifugujeme 2 min při 100 g. Za těchto podmínek zbytky buněk sedimentují a protoplasty vyflotují do zúženého hrdla kyvety. Protoplasty se odeberou pipetou, zředí 35 ml CPW media, v kyvetě podvrství 3 ml roztoku 10 mM MES-KOH pH 5.5 (obsahujícího 0.6 M sacharosu a 5 mM CaCl<sub>2</sub>), převrství 3 ml 0.2 M CaCl<sub>2</sub> v 10 mM MES-KOH pufru, a centrifugují 3 min při 100 g. Horní vrstva obsahuje převážně protoplasty epidermis, spodní vrstva protoplasty palisádového parenchymu [2]. Tyto protoplasty odebereme pipetou a zředíme do 10 ml 0.45 M manitolem.

Takto získané protoplasty používáme po jejich rozbití na síťce s otvory 20 mm pro izolaci buněčných organel. Pokud používáme připravené protoplasty ke kultivaci, sterilizujeme použité listy 2 % přípravkem SAVO a pracujeme důsledně za sterilních podmínek ve flow-boxu. Roztoky sterilizujeme v autoklávu, enzymy pro izolaci protoplastů nejprve centrifugujeme (10 min 20 000 g), a pak sterilizujeme za chladu filtrací přes filtr s póry 0,45 mm. Stejným způsobem sterilizujeme i suspenzi TMV a roztok poly-L-ornithinu.

Při **inokulaci protoplastů virem mosaiky tabáku** (TMV) používáme čerstvě izolovaný virus [3] (40 mg TMV/5 ml 2 mM citrátového pufru pH 5.4 obsahujícího 0.45 M manitol). Tato suspenze se smíchá s 5 ml stejného pufru obsahujícího 40 mg poly-L-ornithinu (PLO, MW 118 000), po 20 min se přidá do 10 ml čerstvě připravených protoplastů (cca 10<sup>6</sup> ptpl/ml) a nechá reagovat 30 min při 25° C. Protoplasty se oddělí od neadsorbovaného viru centrifugací (10 min 100 g), třikrát promyjí 0.45 M manitolem s 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> a resuspendují v CPW mediu na výslednou koncentraci cca 10<sup>5</sup> ptpl/ml. Takto získané protoplasty inkubujeme v objemech po 10 ml ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách za konstantního osvětlení při 40 mmol . m<sup>-2</sup> . s<sup>-1</sup> a teplotě 25° C. Kontrolní neinokulované (mock-inoculated) protoplasty připravujeme přesně stejným způsobem bez aplikace TMV. Vzhled a kvalitu protoplastů kontrolujeme mikroskopicky (zvětšení 200x) v Bürkerově komůrce, kde rovněž stanovujeme jejich **viabilitu** pomocí methylenové modře [4] (živé protoplasty se nebarví modře).

Při stanovení *obsahu TMV v protoplastech* používáme standardní metody DAS-ELISA s použitím králičích polyklonálních protilátek připravených proti izolátu TMV-vulgare a protilátek s navázanou alkalickou fosfátasou. Obsah viru byl stanoven z kalibrační křivky purifikovaného TMV pomocí softwaru popsaného v “Metodách enzymové imunanalýzy” [5].

Při imunoenzymatickém stanovení *procenta inokulovaných protoplastů* centrifugujeme inkubované protoplasty 10 min při 160 g, sediment dvakrát promyjeme 5 ml vychlazeného (0-4°C) roztoku 0.35 M KCl v 10 mM MES-KOH pufru pH 5.5, třikrát 3 ml vychlazeného 96 % ethylalkoholu a dvakrát PBS (0.15 M NaCl v 50 mM draselném fosfátovém pufru pH 7.0) při standardním centrifugačním postupu (2 min při 100 g). Protoplasty resuspendujeme v 1 ml PBS pufru obsahujícím 2 ml anti-TMV IgG konjugované s alkalickou fosfátasou a inkubujeme 16 h při 4°C. Po zředění PBS vzorek centrifugujeme 5 min při 160 g, protoplasty resuspendujeme ve 2 ml TNM pufru (0.1 M tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) a centrifugujeme 5 min při 160 g. Získané protoplasty resuspendujeme v 0.1 ml TNM pufru a přidáme 2 - 5 ml roztoku BCIP a NBT (0.5 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfátu a 7.5 mg nitroblue tetrazolium se rozpustí v 1 ml dimethylformamidu, a pak se přidají 2 ml TNM pufru). Reakce probíhá 1.5 - 3 hod při 37°C. Infikované protoplasty se zbarví černomodře a jejich počet se určí v Bürkerově komůrce. Relativní chyba stanovení není vyšší než 2 %.

Největší *technické problémy* jsou dány již samotnými vlastnostmi protoplastů, jejich relativní nestabilitou, křehkostí a snadnou evakuolizací vlivem používaných osmotik. Další problémy vznikají při zachování sterilních podmínek při přípravě a kultivaci protoplastů. Je nutné nalézt kompromis mezi intenzitou a délkou sterilizace listových pletiv přípravkem SAVO, což ovlivňuje viabilitu. Dalším problémem je flotace protoplastů, které se nelze vyhnout. V tomto případě je nutné měnit osmolaritu přidávaných sacharosů, dokud nedojde k flotaci protoplastů. A asi největším a zcela obecným problémem je závislost kvality a vlastností připravených protoplastů měnící se v závislosti na stáří rostlin, prostředí kultivace a ročním období. Při sledování počtu infikovaných protoplastů je důležité odzkoušet množství přidávaného roztoku BCIP s NBT (2-5 ml). Při nižším množství se infikované protoplasty nedostatečně obarví, při vyšším množství může docházet k nespecifickému barvení, nutno provést kontrolu na neinfikovaných protoplastech.

#### Literatura:

- [1] **Cocking E.C., Peberdy J.F.:** The Use of Protoplasts from Fungi and Higher Plants as Genetic Systems. University of Nottingham, Nottingham, 1974.
- [2] **Fannin F.F., Shaw J.G.:** Plant Sci **51**, 305-310, 1987.
- [3] **Gooding G.V., Hebert T.T.:** Phytopathology **57**, 1285, 1967.
- [4] **Hooley R., McCarthy D.:** Physiol. Plant Pathol. **16**, 25-38, 1980.
- [5] **Mančal P.:** Metody Enzymové Imunanalýzy - Ústav sér a očkovacích látek, Praha 1987

## Měření katalytické aktivity sacharosynthasy v *in vitro* pěstovaných mikrohlízkách bramboru

Vojtěchová, M.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, Praha 6-Ruzyně  
tel: 02/36 08 51 1. 445, e-mail: vojtech@genbank.vurv.cz

Sacharosynthasa (UDP-glukosa D-fruktosa 2-glukosyl transferasa, E.C. 2.4.1.13.) katalysuje zvrtnou reakci :



pH optimum reakce ve směru štěpení je 6.6, pH optimum ve směru syntézy sacharosy je 8.8. V podmínkách *in vivo* je rovnováha posunuta ve prospěch štěpení sacharosy (1,2). Aktivita enzymu se stanovuje jako mmol produktu vzniklého za minutu. Principem metody je kolorimetrická analýza produktů (sacharosy nebo fruktosy) přítomných v reakční směsi po zastavení enzymové reakce.

Z přístrojového vybavení je nutná centrifuga (nejlépe chlazená), spektrofotometr měřící ve viditelné části spektra, termostat na inkubaci vzorků a vodní lázeň na zahřívání zkumavek.

Vzorek může být čerstvý, nebo zmrazený v tekutém dusíku a uchovávaný při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cca 200 mg vzorku přesně se homogenisuje ve vychlazené porcelánové mističce se 3x 2.0 ml studeného extrakčního pufru (20 mM MES pH 6.5 + 0.5 mM DTT), centrifuguje se 5' při cca 2000 x g a supernatant se odsolí do stejného pufru podle Penefského (3).

Na přípravu odsolovacích kolonek podle Penefského používáme plastické špičky k pipetám 1000 ml které ucpeme ve špičce malým kouskem vaty. Kolonky Sephadexu G-25 Medium se nalijí a ekvilibrují jako normální kolony na chromatografii. Pak se nasadí na malou zkumavku nebo se prostrčí proděravělým víčkem eppendorfky, odcentrifuguje se přebytečný pufr, vymění se spodní nádobka, nanese se vzorek a vše se znovu zcentrifuguje. Ve spodní nádobce se sebere odsolený vzorek. Kapacita vzorku je 20% objemu kolony. Maximální použitelná rychlost je 1000 x g. Je možno použít i úhlový rotor.

### Měření aktivity ve směru syntézy sacharosy:

Enzymový preparát (1/10 celkového objemu reakční směsi) se inkubuje s 10mM Fru a 10 mM UDPG v 50 mM Tris-Cl pH 7.5. Do reakční směsi je možno přidat aktivátory 15 mM  $\text{MgCl}_2$  a 1 mM DTT a 5 mM NaF (jako inhibitor UDPG- a ADPG-pyrofosforylas; nutné pouze u hrubých extraktů a částečně purifikovaných vzorků). Jako slepý pokus inkubujeme obsahuje vzorek enzymu, který byl předem tepelně denaturován. Reakce se ukončí přidáním stejného objemu 5N NaOH a 10 min. zahříváním ve vroucí vodní lázni (inaktivace enzymu a rozložení se nezreagované fruktosy). Stanovení sacharosy se provádí anthronovou metodou (4).

### Měření aktivity ve směru štěpení sacharosy:

Enzymový preparát (1/10 celkového objemu reakční směsi) se inkubuje s 100mM sacharosou a 5mM UDP v 20 mM HEPES-KOH 7.0. Do reakční směsi je možno přidat 5 mM NaF jako inhibitor pyrofosforylas. Jako slepý pokus inkubujeme obsahuje vzorek enzymu, který byl předem tepelně denaturován. Je nutné mít kromě slepého vzorku také kontrolu bez UDP - pozadí invertasy. Reakce se ukončí zahříváním 1 - 2 minuty na vroucí vodní lázni nebo tři minuty při  $95^{\circ}\text{C}$ . Fruktosu stanovíme metodou podle Somogyiho-Nelsona (4)

### Anthronová metoda stanovení sacharidů: (4):

do 15 ml zábrusové zkumavky se napipetují 3 ml anthronového činidla (2 mg anthronu/ml konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , nutno připravovat denně čerstvý) a převrství se 1 ml vodného roztoku vzorku. Opatrně se protřepe za chlazení v ledové lázni, aby nedošlo k přílišnému zahřátí směsi. Zahřívá se na vroucí vodní lázni 5 minut a potom se ochladí vodou. Měří se absorbance při 625 nm. Současně se měří kalibrační křivka o koncentracích mezi 10 a 80mg/ml sacharosy.

#### Stanovení redukujících cukrů podle Somogyiho a Nelsona (4):

Činidlo I: v 800 ml H<sub>2</sub>O se rozpustí 24 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16 g NaHCO<sub>3</sub>, 12 g vlnanu sodno-draselného a 144 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Činidlo II: ve 200 ml H<sub>2</sub>O se rozpustí 4 g CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O a 36 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Pracovní činidlo se připravuje těsně před použitím smícháním 4 dílů činidla I a 1 dílu činidla II.

Arsenomolybdatové činidlo: ve 450 ml H<sub>2</sub>O se rozpustí 25 g bezvodého molybdenanu amonného, za chlazení a míchání se přidá 21 ml konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 3 g Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O rozpuštěné ve 25 ml H<sub>2</sub>O. Nechá se stát 24 hodin při 37°C, zfiltruje se a uchovává se v temnu. 1 ml vodného roztoku vzorku se smíchá s 1 ml pracovního činidla a 10 min. se vaří na vodní lázni. Po ochlazení se přidá 1 ml arsenomolybdatového činidla, dobře se promíchá a naředí se H<sub>2</sub>O na 10 ml. Odečítá se absorbance při 550 nm. Současně se měří kalibrační křivka o koncentracích mezi 10 a 80 mg/ml glukosy nebo fruktosy.

Kolorimetrické metody používané pro analýzu produktů reakce jsou relativní metody, které vyžadují kalibraci, a to pokud možno současně s měřením vzorků. Pro výpočet katalytické aktivity je nutno experimentálně ověřit, že závislost koncentrace produktů na čase je v daném intervalu za daných podmínek (teplota, pH, koncentrace substrátů a enzymu) lineární. Pro výpočet koncentrací cukrů pomocí kalibrační křivky lze použít libovolný počítačový program, schopný provádět matematické výpočty. Obě použité metody jsou finančně a přístrojově nenáročné, zato jsou poměrně náročné na čas a manipulaci.

Anthronová metoda je dost nepříjemná tím, že se pracuje s koncentrovanou kyselinou sírovou, a pokud se do směsi dostane další voda (např. při měření), dojde ke vzniku bílého zákalu, který vzorek znehodnotí. U obou stanovení dochází při delším stání k samovolným změnám zbarvení (a tedy ke změnám v molárních absorpčních koeficientech) a u stanovení podle Somogyiho a Nelsona se v roztoku po naředění tvoří bublinky CO<sub>2</sub>, které ruší při odečítání absorbance. Se stanovením podle Somogyiho a Nelsona rovněž interferuje přítomnost redukčních činidel.

Pro měření lze použít široké spektrum pufrů a aktivita není významně ovlivněna ani iontovou silou. Enzym není absolutně specifický pro UDP, aktivita s ADP dosahuje asi 70% aktivity s UDP a s TDP asi 30% aktivity s UDP (1). Enzymová reakce ve směru syntézy sacharosy je inhibována produktem UDP, ve směru štěpení sacharosy produkty fruktosou a UDP-glukosou (2). Pro měření aktivity ve směru štěpení sacharosy v hrubých extraktech *in vitro* rostoucích bramborových hlízek nelze pracovat v oblasti pH blízké pH optimu kvůli vysoké aktivitě kyselých invertasy. Pro měření ve směru syntézy sacharosy zase může interferovat vysoká aktivita pyrofosforylas.

Kolorimetrická stanovení nejsou příliš specifická, proto se nehodí pro měření enzymové aktivity v neodsolených hrubých extraktech. Specifické stanovení UDP-glukosy pomocí UDP-glukosadehydrogenasy a stanovení fruktosy spřaženou reakcí fosfoglukoisomerasa-hexokinasa-glukosa 6-fosfátdehydrogenasa jsou sice velmi specifická, ale jsou poměrně nákladná, a i zde je potřeba brát v úvahu možnou interferenci některé ze složek vzorku s enzymovým stanovením. Analýzu produktů je rovněž možno provést pomocí HPLC, nebo je možno použít značených substrátů a následné separace a analýzy produktů reakce scintilačním počítačem; pro rutinní stanovení aktivity se však tyto metody pro svou nákladnost a komplikovanost nepoužívají.

#### Bibliografie:

1. Pressey,R (1969): Potato sucrose synthase: purification, properties and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.* 44, 759-764.
2. Wolosiuk,RA; Pontis,HG (1974): The role of sucrose and sucrose synthase in carbohydrate plant metabolism. *Mol.Cell.Biochem.* 4, 115-123.
3. Penefsky,H(1977) Reversible binding of inorganic phosphate by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252, 2891 - 2899.
4. Ashwell,G (1957): Colorimetric Analysis of Sugars. In: *Methods of Enzymology*. 1st ed. Vol. 3. (Eds: Colowick,SP; Kaplan,NO) Academic Press Inc, New York, 73-105.

## Imunoafinitní chromatografie cytokininů

Vaňková, R., Gaudinová, A., Süssenbeková, H., Dobrev, P., Strnad, M., Holík, J.

Ústav experimentální botaniky AVČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha 6  
tel: 02/36 81 58, fax: 02/36 81 59, e-mail: vankova@ueb.cas.cz

### 1. PRINCIP IMUNOAFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE (IAC)

Principem IAC je izolace látek na základě jejich interakce se specifickou protilátkou navázanou na pevném nosiči. Většina sloučenin ve vzorku projde IAC kolonou nezadržena, nespecificky nasorbované sloučeniny se vymyjí pufrem a specificky zachycené sloučeniny se eluují vhodným činidlem (např. methanolem). Tímto způsobem se dosáhne v jednom chromatografickém kroku takového stupně vyčištění vzorku, kterého lze jen stěží dosáhnout chromatografií na fyzikálně-chemickém základě.

### 2. METODIKA

#### 2.1. Nezbytné vybavení

IAC není náročná na přístrojové vybavení. Plně postačuje klasické zařízení chemické laboratoře (centrifuga, třepačka, spektrofotometr, radiometr). Jejím nezbytným předpokladem je ovšem dostatečně velké množství protilátek (řádově desítky mg) o vhodné specifitě. Nosiče pro vazbu protilátek jsou komerčně snadno dostupné, a to i v aktivované formě.

#### 2.2. Příprava imunosorbentu

**Protilátky.** Pokud jsou pro přípravu imunosorbentu používány monoklonální protilátky, pak při vysokém titru stačí jejich několikanásobné (3x) přesrážení síranem amonným (50% nasycení). Pokud jsou používány polyklonální protilátky, je nezbytné jejich afinitní vyčištění. Protilátky jsou selektovány a testovány pomocí kompetitivní RIA. Protilátky proti cytokininům nesmí vykazovat křížovou reakci s adeninem ani s adenosinem, které se vyskytují v rostlinných vzorcích v koncentracích řádově vyšších než stanovované cytokininy. Pro přípravu imunosorbentu je výhodnější použít protilátky se širší, tzv. skupinovou specifitou (např. protilátky proti isopentenyladenosinu s výraznou interakcí s *trans*-zeatin ribosidem a dihydrozeatinem). Skupinově specifické sorbenty umožňují zachytit ze vzorku celou skupinu příbuzných látek, v našem případě všechny isoprenoidní cytokininy (s výjimkou 7N- a O-glukosidů, které vyžadují vlastní protilátky). Obecně platí, že protilátky připravené proti nepolárním N<sup>6</sup>-substituovaným haptenum (např. isopentenyladenosinu) vykazují širší specifitu (Strnad et al., 1990). V případě úzce specifických protilátek lze použít směs dvou nebo více protilátek.

**Vazba na nosič.** Tradiční způsob vazby protilátek na nosič využívá funkčních skupin proteinu (např. volných aminoskupin). Ve velké srovnávací studii imunosorbentů pro cytokininy (Davis et al., 1986) se jako nejlepší ukázal Affi-Gel 10 (zesíťovaná agarosa s desetiuhlíkatým oddalovacím ramínkem - "spacerem"). Výhodou této metody je velmi snadné provedení; orientace protilátek navázaných na nosič je ovšem náhodná ("random"). Zvláště v případě vysokomolekulárních substrátů je pak řada vazebných míst na protilátkách stericky nepřístupná. Hoffman a O'Shanessy (1988) zavedli orientovanou imobilizaci protilátek. Využili skutečnosti, že pouze na Fc fragmentu protilátky (krystalická, konstantní část) jsou cukerné zbytky. Ty lze oxidovat buď jodistanem sodným nebo enzymaticky (v závislosti na typu cukerného zbytku galaktosaoxidáso, příp. kombinací neuraminidasy a galaktosaoxidasy). Vzniklé aldehydicke skupiny velmi snadno a pevně reagují s hydrazidovými skupinami. Tento postup vyžaduje odsolení protilátek po jejich oxidaci, protože přítomnost jodistanu ruší vazbu na nosič. Množství navázaných protilátek se v obou případech stanovuje spektrofotometricky (z rozdílu koncentrace ve vzorku před vazbou a po ní).

### 2.3. *Imunoafinitní chromatografie*

Po získání imunosorbentu se stanoví jeho maximální kapacita pro jednotlivé cytokininy. Na IAC kolonu se aplikuje směs radioaktivně značeného a neznačeného cytokininu, tak aby bylo dosaženo vhodného hmotového zatížení při dostatečné aktivitě. Po promytí pufrem a vodou je specificky navázaný cytokinin eluován vychlazeným methanolem. Kolona musí být okamžitě promyta vodou a pufrem. Je zapotřebí stanovit kapacitu imunosorbentu a výtěžnost pro jednotlivé cytokininy ve směsi, v koncentrační oblasti mírně převyšující hodnoty cytokininů ve vzorcích. Rozdílná afinita jednotlivých cytokininů vůči protilátkám se totiž může projevit v jejich maximální kapacitě (příp. výtěžnosti) až při kompetici s ostatními cytokininy.

### 2.4. *Porovnání orientované a neorientované vazby protilátek*

Orientovaná imobilizace, která umožnila značně zvýšit kapacitu imunosorbentů u řady vysokomolekulárních látek (např. Petkov et al. 1990), v případě cytokininů nevykázala výrazný účinek. Je možné, že protilátky navázané přes spacer ( $C_{10}$ ) na Affi-Gel 10, mají dostatek konformační volnosti umožňující cytokininům dobrý přístup. Maximální kapacity imunosorbentů získaných oběma přístupy byly v podstatě stejné (Vaňková et al., podáno do tisku).

## 3. FINANČNÍ NÁROČNOST

Finanční náročnost metody je dána dostupností vhodných protilátek (v dostatečném množství). Cena sorbentů od renomovaných firem (např. Bio-Rad: Affi-Gel 10, Affi-Gel Hz) sice rovněž není zanedbatelná, ale lze s úspěchem použít i sorbenty vyrobené v tuzemsku (např. perlová celuloza Perloza MT 200 - Hz). Oba typy nosičů vykazovaly při přípravě imunosorbentů pro cytokininy velmi podobné vlastnosti (Perloza měla dokonce o něco vyšší vazebnou kapacitu).

## 4. POTENCIÁLNÍ ZDROJE POTÍŽÍ

Protilátky, stejně jako jiné proteiny, jsou citlivé na napětí. Proto je třeba se vyhnout nadměrnému třepání apod. Citlivost jednotlivých protilátek vůči jodistanu se liší. Je proto lépe volit alespoň zpočátku sníženou teplotu (4°C) a kratší dobu inkubace (30 min). Při vazbě protilátek na nosič je zapotřebí dosáhnout co nejlepšího kontaktu s nosičem, ale zároveň šetrně (lepší než třepačka je kývačka nebo rotační odparka). Při IAC je někdy vhodné nanést vzorek opakovaně nebo zastavit na určitou dobu průtok. Methanol pro eluci by měl být dobře vychlazený. Životnost kolony lze výrazně prodloužit zařazením předkolony s nescifickými protilátkami. Dobře udržované kolony si uchovávají svou kapacitu až několik let, pokud nedojde k jejich mikrobiální kontaminaci (musí být skladovány v pufrech obsahujícím azid).

## 5. UPLATNĚNÍ

V poslední době se IAC stále více uplatňuje ve standardním analytickém postupu stanovení CK. Ionexové chromatografie by měly předcházet IAC, vzhledem k tomu, že by vzorky měly být pokud možno zbaveny fenolů a barviv. Přechištění na IAC výrazně zpřesní analýsu a zlepší detekční limit, protože při následné HPLC nedochází k případnému nekontrolovatelnému posunu retenčních časů vlivem přítomnosti velkého množství jiných látek ve vzorku a i konečné imunostanovení (ELISA, RIA) není rušeno nežádoucími interferenčními látkami.

### Literatura:

Davis, G.C., Hein, M.B. a Chapman, D.A. (1986) Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules. *J.Chromatogr.* 366: 171-189.

Hoffman, W.L. a O'Shannessy, D.J. (1988) Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports. *J. Immunol. Methods* 112: 113-120.

- Petkov, L., Sajdok, J., Rae, K., Suchová, M., Káš, J. a Turková, J. (1990) Activation of galactose-containing glycoprotein and solid supports by galactose oxidase in presence of catalase for immobilization purposes. *Biotechnol. Techniques* 4(1): 25-30.
- Strnad, M., Vaněk, T., Binarová, P., Kamínek, M. a Hanuš, J. (1990) Enzyme immunoassays for cytokinins and their use for immunodetection of cytokinins in alfalfa cell culture. *V Molecular Aspects of Hormonal Regulation of Plant Development*. (Kutáček, M., Elliott, M.C. and Macháček, I., eds.) str. 41-54. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Vaňková, R., Gaudinová, A., Sussenbeková, H., Dobrev, P., Strnad, M., Holík, J. a J. Lenfeld. (podáno do tisku) Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins. *Plant Cell Physiol*.

