

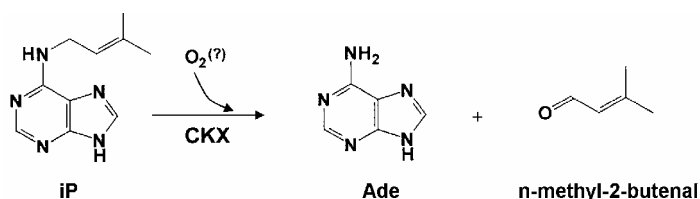
Stanovení aktivity cytokininoxidasy/dehydrogenasy v rostlinách pomocí HPLC spojené s průtokovým radioaktivním detektorem

PETRE I. DOBREV, VÁCLAV MOTYKA

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6 (tel.: 220 390 444, e-mail: dobrev@ueb.cas.cz)

Úvod

Hladina endogenních cytokininů v rostlinách je ovlivňována různými regulačními mechanismy. Ty zahrnují (1) akumulaci cytokininů na základě jejich přímé nebo autoindukované biosyntézy, (2) jejich inaktivaci konjugací s glykosidy nebo nevratnou degradací na adenin, případně jeho derivát(y). Klíčovým enzymem degradujícím v rostlinných pletivech biologicky aktivní cytokininy je cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX), která katalyzuje odbourávání postranního řetězce cytokininů na N^6 adeninu (obr. 1).



Obr. 1. Degradace N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninu (iP) cytokininoxidasou/dehydrogenasou

Přehled a podstata metod stanovení aktivity cytokininoxidasy/dehydrogenasy v rostlinách

Enzymová aktivita CKX se obvykle stanovuje radioisotopovou metodou po inkubaci přečištěného proteinového extraktu s N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninem (iP) radioaktivně značeným v purinovém kruhu, následné chromatografické separaci a měření radioaktivity vzniklého produktu adeninu (Ade). Aktivita CKX se zpravidla vyjadřuje v nanomolech vzniklého Ade na 1 mg bílkovin za hodinu.

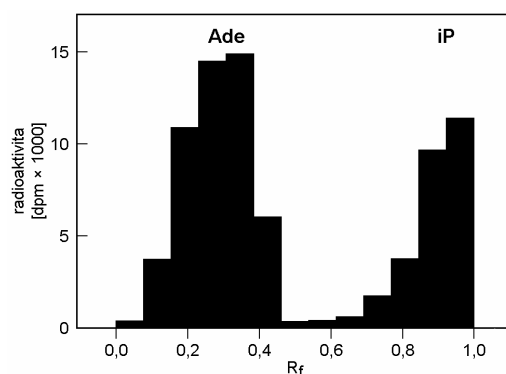
Existují i jiné metody stanovení aktivity CKX, například kolorimetrickým stanovením Schiffovy báze vznikající enzymovou reakcí mezi 3-methyl-2-butenalem a *p*-aminofenolem (Libreros-Minotta a Tipton 1995) nebo formazonu, který je v umělém redoxním systému konečným produktem enzymové oxidoredukční reakce fenazinmethosulfátu (Kulkarni *et al.* 2001, Frébort *et al.* 2002).

Pracovní postup

Stanovení na základě měření konverse [^3H]iP pomocí TLC

V naší laboratoři se aktivita CKX stanovuje běžně radioisotopovou metodou, tj. na základě měření konverse [^3H]iP na [^3H]Ade (Motyka a Kamínek 1994, Motyka *et al.* 1996). Inkubační směs obsahuje 100 mM pufr (TAPS-NaOH nebo H_3BO_3 -KCl-NaOH,

pH 8,5, příp. MOPS-NaOH, pH 7,2), 2 - 10 μM substrát ($[^3\text{H}]\text{iP}$, 1,6 - 7,4 $\text{Bq}\cdot\text{mol}^{-1}$) a enzymový extrakt v celkovém objemu 50 μl . Po skončení inkubace při 37 °C se reakce ukončí 10 μl 200 mM Na_4EDTA a 120 μl studeného ethanolu. Po centrifugaci (5000 rpm, 5 min) se supernatant aplikuje na polyesterové TLC desky mikrokrystalické celulosy (Polygram CEL 300 UV₂₅₄, Sigma Aldrich) a vyvíjí se v horní fázi směsi ethylacetát/*n*-propanol/voda (4 : 1 : 2, v/v/v). Za těchto podmínek se iP poměrně obtížně zachytí (R_f 0,8 - 1), zatímco Ade téměř nemigruje (R_f 0,2 - 0,3, obr. 2). Obdobné rozlišení iP a Ade jsme zjistili rovněž při použití hliníkových silikagelových TLC folií (Silufol, Kavalier, ČR) nebo polyesterových TLC desek silikagelu (Acid washed Silica gel UV₂₅₄, Sigma Aldrich) vyvíjených v soustavě chloroform/methanol (3 : 1, v/v) nebo v methylenchloridové směsi obsahující 15 % methanolu (iP: R_f 0,7 - 0,8, Ade: R_f 0,2 - 0,3). Po separaci se TLC deska rozstříhá na proužky do scintilačního koktejlu (Sigma-FluorTM, Sigma) a kapalinovým scintilačním počítačem (Packard TRI-CARB 2500 TR) se měří radioaktivita vzniklých metabolitů.



Obr. 2. Separace Ade a iP pomocí TLC na mikrokrystalické celulose

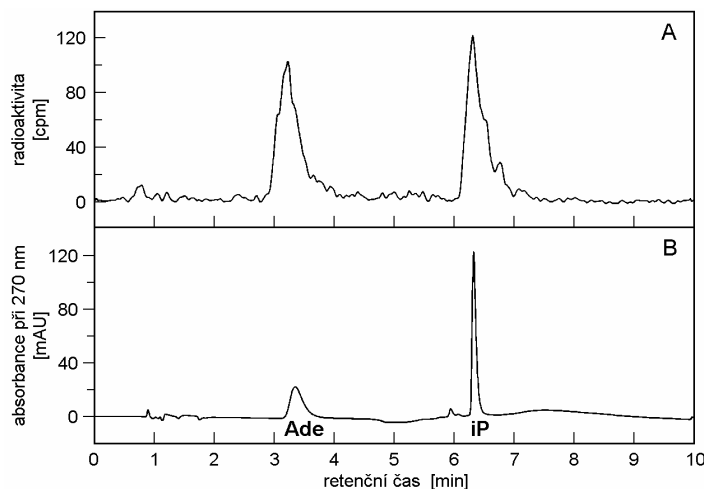
Stanovení konverse $[^3\text{H}]\text{iP}$ pomocí TLC má řadu výhod, zejména možnost současné analýzy většího počtu vzorků, poměrně nízkou spotřebu rozpouštědel a relativně nízké náklady. Na druhé straně má ovšem i některé nevýhody, jako např. nižší rozlišení, pracnost, nutnost manipulace s nebezpečnými chemikáliemi a vyšší rozptyl měřených hodnot. Abychom vyřešili tyto nevýhody, vypracovali jsme metodiku pro stanovení produktu a substrátu reakce katalyzované CKX pomocí HPLC spojené s *on-line* detektorem radioaktivity.

Stanovení na základě měření konverse $[^3\text{H}]\text{iP}$ pomocí HPLC

Sestava HPLC (Perkin Elmer Series 200 LC pumpa) je napojena na průtokový detektor (Diode Array Detector 235C, Perkin Elmer) a na autosampler (Series 200, Perkin Elmer). Eluát z DAD detektoru se měří na detektoru radioaktivity Ramona 2000 (Raytest, kyveta 600 μl). K chromatografické separaci se používá kolona Luna C8 (Phenomenex) o délce 50 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikosti částic náplně 3 μm . Průtoková rychlost je 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, teplota kolony 35 °C, UV detekce se provádí při 270 nm. Jako mobilní fáze se používají roztok A (40 mM CH_3COOH + NH_4OH , pH 5,0) a roztok B ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{CN}$,

1 : 1, v/v) v gradientu 1 - 70 %B 1 min, 70 %B 1 min, 70 - 1%B 1 min, ekvilibrace 1 %B 10 min.

Pro *on-line* měření radioaktivity detektorem Ramona 2000 se získaný eluát míchá se scintilačním koktejlem v poměru 3 : 1 (v/v). Radioaktivní metabolity jsou identifikovány na základě shody retenčních časů se standardy. Za uvedených podmínek se Ade a iP na HPLC velmi dobře dělí s retenčními časy 3,3 a 6,3 min (obr. 3). Analýza jednoho vzorku trvá 13 minut, lze tedy analyzovat 45 vzorků za 10 hodin.



Obr. 3. Separace Ade a iP pomocí HPLC spojené s průtokovým radioaktivním detektorem. A - signál z detektoru radioaktivity, B - signál z DAD detektoru

Doporučení, omezení, tipy

Substrát (iP) a produkt (Ade) reakce katalyzované CKX se značně liší v hydrofobních vlastnostech. Ade je mnohem hydrofilnější, a proto na TLC desce téměř nemigruje, zatímco iP se pohybuje s čelem (obr. 2). Hodnoty R_f pro Ade a iP při TLC jsou na hranici doporučené pro optimální rozlišení (R_f 0,1 - 0,8). Při těchto hraničních R_f hodnotách je vyšší pravděpodobnost současné migrace interferujících látek.

Pro HPLC s reversní fází je vhodné, aby kapacitní faktory byly 1 - 10 a doba analýzy minimální. Toho lze dosáhnout použitím gradientu, kratší kolony, hydrofilnější stacionární fáze, apod. V našem případě používáme kolonu o délce 50 mm a stacionární fázi s kratší alkylovou skupinou (C8), aby se snížil eluční čas hydrofobního iP. Eluční gradient je zahájen nízkou koncentrací organické fáze (1 %B), při níž dochází k retenci polárního Ade, a prudce zvýšen (na 70 %B), aby se iP eluoval ihned po Ade. Vzorek by měl mít nízký obsah organického rozpouštědla, aby byl vrchol Ade ostrý. Reprodukovatelnost měření je velmi dobrá, relativní standardní odchylka je ≥ 5 %. Navíc je HPLC díky automatizaci a *on-line* měření radioaktivity méně pracná a časově méně náročná.

Zhodnocení metod – výhody a nevýhody

Z výše uvedených údajů je zřejmé, že jak HPLC, tak TLC mají pro stanovení aktivity CKX své výhody i nevýhody. Jejich shrnutí je uvedeno v následujícím přehledu.

	výhody	nevýhody
TLC	možnost současné analýzy více vzorků nízká spotřeba rozpouštědel nízké náklady jednoduché provedení	nižší rozlišení pracnost manipulace s nebezpečnými chemikáliemi vyšší odchylka měřených hodnot
HPLC	vysoké rozlišení nízká odchylka měřených hodnot automatizace 2 - 3 krát rychlejší než TLC	drahé přístrojové vybavení potřeba kvalifikovaných pracovníků

Závěr

Vzhledem k tomu, že za rozhodující faktor pokládáme schopnost rychlého a rutinního měření velkého počtu vzorků s vysokou přesností a spolehlivostí, upřednostňujeme pro stanovení aktivity CKX metodu HPLC.

Literatura

- Frébort, I., Šebela, M., Galuszka, P., Werner, T., Schmülling, T., Peč, P. 2002. - Anal. Biochem. **306**: 1.
- Kulkarni, M.J., Theerthaprasad, D., Sudharshana, L., Prasad, T.G., Sashidhar, V.R. 2001. - Phytochem. Anal. **12**: 180.
- Libreros-Minotta, C.A., Tipton, P.A. 1995. - Anal. Biochem. **231**: 339.
- Motyka, V., Faiss, M., Strnad, M., Kamínek, M., Schmülling, T. 1996. - Plant Physiol. **112**: 1035.
- Motyka, V., Kamínek, M. 1994. - J. Plant Growth Regul. **13**: 1.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (LN 00A081).

Studium transgení RNA

MILOSLAVA FOJTOVÁ

Laboratoř molekulární epigenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65, Brno
(tel.: 541 517 230, fax: 541 211 293, e-mail: fojtova@ibp.cz)

Stabilní exprese rostlinného transgenu je kritickým parametrem pro praktické využití geneticky modifikovaných rostlin. Je známo, že rozdíly v expresi transgenu u jednotlivých