

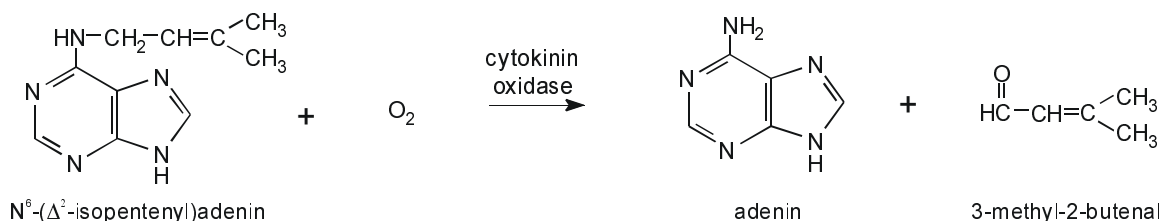
Extrakce a stanovení aktivity cytokininoxidasy v obilkách pšenice a v kalusové kultuře tabáku

VÁCLAV MOTYKA, MIROSLAV KAMÍNEK

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6, tel.:02/203 90 437, email: vmotyka@ueb.cas.cz

Úvod

Cytokininoxidasa (CKOX) je enzym, který specificky katalyzuje metabolickou degradaci isoprenoidních cytokininů odštěpením nenasyceného N^6 -postranního řetězce na adenin nebo jeho derivát a aldehyd odpovídající postrannímu řetězci (obr.1). Přehled metod stanovení aktivity CKOX v rostlinných pletivech je uveden v jiném příspěvku tohoto sborníku. Předmětem této práce je specifikace a optimalizace podmínek stanovení aktivity tohoto enzymu ve vyvíjejících se obilkách jarní pšenice a v kalusové kultuře tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), tj. v pletivech, v nichž se vyskytují různé formy CKOX s odlišnými biochemickými vlastnostmi (pH optimum, glykosylace proteinu atd.)



Obr.1. Schéma reakce katalyzované cytokininoxidasou

Extrakce bílkovinného preparátu

Extrakce bílkovinného preparátu vychází z modifikace metody Chatfielda a Armstronga (1986). Všechny kroky extrakčního postupu provádíme v chladové místnosti při teplotě 0-4°C. Obilky pšenice (ekvivalent 1 g FW) nebo kalusové pletivo tabáku (ekvivalent 5 g FW) předhomogenizujeme v třecí misce s tekutým dusíkem a následně zhomogenizujeme (sonikace + homogenizátor UNIPAN 309) ve vychlazeném extrakčním pufru (0.1 M TRIS-HCl, pH 7.5). Homogenáty nanese na kolony obsahující 1.5 g polyvinylpyrolidinu (PVP, Polyclar AT), důkladně promícháme a zfiltrujeme. Spojené filtráty takto zbavené fenolických látek odstředíme (10 000 g, 10'). Ze vzorků vysrážíme nukleové kyseliny a část nukleoproteidů přidáním Polyminu P (1 % v/v, pH 7.5) a odstraníme centrifugací (10 000 g, 10'). Optimální koncentraci Polyminu P je třeba vyzkoušet pro každý rostlinný materiál (volíme maximální koncentraci, při které ještě nedochází k snížení CKOX aktivity preparátu). Po odstředění k supernatantu za stálého míchání přidáváme $(NH_4)_2SO_4$ v množství odpovídajícím dosažení 80 % saturace. Vzniklou suspenzi necháme minimálně 30 minut stát v chladu a potom odstředíme (13 000 g, 40'). Po odstranění supernatantu zmrazíme sediment tekutým dusíkem a uložíme při -70°C. Takto připravené bílkovinné preparáty jsou poměrně stálé a při -70°C je lze

uchovávat bez výrazné ztráty enzymové aktivity po dobu několika týdnů.

Stanovení enzymové aktivity

Enzymovou aktivitu CKOX stanovujeme testy *in vitro* založenými na měření přeměny radioaktivně značeného N⁶-(³H)isopentenyladeninu (iP, značení na purinovém kruhu) na adenin (Ade). Pro testy enzymové aktivity rozpustíme bílkovinné preparáty ve vodě nebo v příslušném pufru (viz.3.1.) a určíme obsah celkových bílkovin metodou podle Bradfordové (1976).

Základní metoda

Testy enzymové aktivity CKOX provádíme v polypropylénových mikrozkušnicích (Eppendorf). Složení reakční směsi (celkový objem 50 µL) pro bílkovinné preparáty z obilky pšenice a kalusu tabáku se vzhledem k jejich různým biochemickým vlastnostem liší a jsou uvedena níže :

a) obilky pšenice		b) kalus tabáku	
pufr (0,1 M MOPS-NaOH, pH 7,2)	20 µl	pufr (0,1 M TAPS-NaOH, pH 8,5)	20 µl
2 µM [2- ³ H]iP (200 µCi/µmol)	10 µl	2 µM [2- ³ H]iP (200 µCi/µmol)	10 µl
bílk. preparát (ekv.1-1,5 mg č.hm.)	20 µl	bílk. preparát (ekv.150-625 mg č.hm.)	20 µl

Směs inkubujeme při 37 °C po dobu 1 h (pšenice) nebo 4 h (tabák). Po skončení inkubace reakci zastavíme dodáním 10 µL Na₄EDTA (200 mM) a 120 µL 95% ethanolu obsahujícího neznačený Ade a iP (a 0,75 mM).

Metoda „zcitlivěná“ přítomností komplexu Cu²⁺-imidazol

Vzhledem k poměrně nízké aktivitě CKOX v kalusovém pletivu tabáku u tohoto materiálu s výhodou využíváme stanovení metodou „zcitlivěnou“ přítomností komplexu Cu²⁺-imidazol (modifikace podle Chatfielda a Armstronga 1987) umožňující až 40-tinásobné zvýšení enzymové aktivity. Pro tento postup používáme inkubační směs následujícího složení:

0,25 M imidazol + 0,0625 M CH ₃ COONa + 0.0375 M CuCl ₂ , pH 6,0	20 µl
2 µM [2- ³ H]iP (200 µCi/µmol)	10 µl
bílk. preparát (ekv.20-80 mg č.hm.)	20 µl

Směs inkubujeme 30 minut při 37 °C, zastavení reakce provádíme stejným způsobem jako u základní metody.

Chromatografické dělení substrátu od produktu

K oddělení nezreagovaného substrátu od značeného produktu reakce katalyzované CKOX používáme chromatografii na tenké vrstvě mikrokrytalické celulózy (desky SigmaCell 20 x 20 cm). Roztoky po ukončení inkubace a následném odstředění (3 000 g, 5') nanášíme v objemu 150 µl na předem vyznačené 2 cm široké pruhy a chromatogramy vyvíjíme v horní fázi směsi ethylacetát/*n*-propanol/H₂O (4:1:2). Zóny

absorbující UV světlo označíme, nastříháme do scintilačních lahvíček a po eluci v 1 ml methanolu (1 hod) přidáme a 5 ml kapalného scintilátoru (SLT-31 nebo Sigma-Fluor). Radioaktivitu měříme kapalinovým scintilačním počítačem (Hewlett-Packard typ Tri-carb 300c).

Z celkové radioaktivity zjistíme poměr nezreagovaného substrátu iP a vytvořeného produktu. Aktivitu CKOX vyjádříme v nmolech vzniklého Ade v přepočtu na 1 mg bílkovin za hodinu.

Náročnost, tipy a triky

Tento postup umožňuje díky své specifitě stanovení aktivity CKOX v poměrně hrubých extraktech z rostlinných pletiv, jakož i u vysoce přečištěných bílkovinných preparátů. S výjimkou chlazené vysokootáčkové centrifugy a scintilačního počítače nevyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Finanční náročnost metody je dána především dostupností značeného substrátu a náklady na kapalný scintilátor.

Vzhledem k tomu, že různé molekulární formy CKOX vykazují různá pH optima (pH 6,0-9,0), je třeba pro každý rostlinný materiál předem stanovit optimální hodnotu pH (bílkovinný preparát je možno po použití znovu zamrazit a bez výraznější ztráty aktivity uložit k dalšímu zpracování). Podmínky reakce by měly být optimalizovány tak, aby radioaktivita vzniklého produktu (Ade) představovala 20-30% radioaktivity celkové. Pro dosažení optimální degradace lze podle potřeby upravit koncentraci použitého bílkovinného preparátu, příp. zkrátit či prodloužit dobu inkubace.

Literatura

- Bradford, M.M. 1976. - Anal Biochem **72**: 248-254
Chatfield, J.M., Armstrong, D.J. 1986. - Plant Physiol **80**: 493-499
Chatfield, J.M., Armstrong, D.J. 1987. - Plant Physiol **84**: 726-731

Poděkování: Tato práce byla finančně podporována granty A 6038002 Grantové agentury AV ČR a 206/96/K188 Grantové agentury ČR.

Crystal structure of a cytokinin-glucoside-specific β -glucosidase from *Zea mays*

JITKA VEVODOVA ^{A,B,C}, JAROMIR MAREK^A, JAN ZOUHAR^B, BRETISLAV BRZOBOHATY^B, XIAO-DONG SU^C

^A Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic, tel.: 46/046/222 45 66, email: vevod@chemi.muni.cz

^B Laboratory of Plant Molecular Physiology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^C Department of Molecular Biophysics, Lund University, Sweden

Introduction

Zm-p60.1 is a member of β -glucosidases belonging to the family 1 of glycosyl hydrolases. β -Glucosidases are an important group of enzymes which are capable of hydrolysing the β -glucosidic bonds of disaccharides, oligosaccharides, or conjugated glycosides. Maize cytokinin-glucoside-specific β -glucosidase, Zm-p60.1, has been suggested to be one of the key enzymes involved in regulation of plant development by relea-