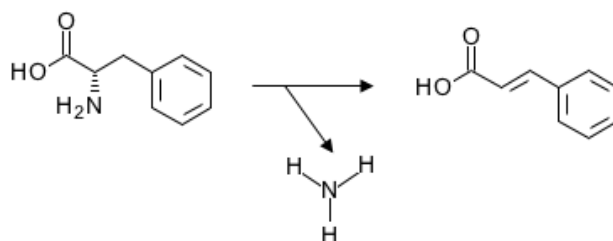


Měření aktivity phenylalaninamoniak lyasy

TEORETICKÝ ÚVOD

V rostlinné buňce existují tři základní regulační enzymy účastníci se syntézy fytoalexinů, phenylalaninamoniak lyasa (PAL), 5-epiaristolochen syntasa (EAS) a 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductasa (HMGR). Aktivace enzymu PAL (EC: 4.3.1.5) je spojena s akumulací fenylypropanoidních látek a se syntézou důležité signální molekuly, kyseliny salicylové. PAL katalyzuje reakci přeměny aminokyseliny L-phenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou:



Aktivita PAL se dá velmi dobře měřit nárůstem absorpance kyseliny trans-skořicové při 290 nm.

Literatura

1. Buchanan B. B., Grissem W., Jones R. L.: Biochemistry & molecular biology

POSTUP PRÁCE

Jednotlivé skupiny si rozdělí izolaci z listů po aplikaci cryptogeinu a kontrolních listů po aplikaci vody sesbíraných v časových intervalech 0h, 6h a 24h po aplikaci.

Izolace enzymu phenylalaninamoniak lyasy

Roztoky:

Izolační pufr (0,1 M Borát (pH= 8.8), 17 mM β -merkптоethanol, 1 % PVP)

0,3 g tkáně vložte do třecí misky, zmrazte v tekutém dusíku a rozetřete v 1.5 ml izolačního pufru. Homogenát nepipetujte do 2.0 ml zkumavky. Centrifugujte 20 minut při 15 000 x g při 4°C. Poté přepipetujte supernatanty do 1.5 ml zkumavky a uchovávejte na ledu.

Měření aktivity enzymu phenylalaninamoniak lyasy

Roztoky:

0,1M Borátový pufr (pH = 8.8)

12 mM L-Phenylalanine

Měření se bude provádět v triplikátu. Do tří 1.5 ml zkumavek napipetujeme jednotlivé složky reakční směsi:

0,1M Borátový pufr (8.8)	150 ul		3x
12 mM L-Phenylalanin	150 ul		

Jako blank použijeme následující reakční směs:

0,1M Borátový pufr (8.8)	150 ul		1x
12 mM D-Phenylalanin	150 ul		

Poté přidejte do každé zkumavky 125 ul enzymového extraktu a inkubujte 30 minut při 30°C. Následně reakci zastavíme přidávkem 150 ul 0,1M TCA. Směs důkladně promíchejte na vortexu a do každé zkumavky přidejte 125 ul vody a směs centrifugujte 10 minut při 15 000 x g. Odsajte supernatant, přepipetujte ho do UV semi-mikro kyvety a změřte absorbanci při 290 nm oproti blanku (reakční směs s D-phenylalaninem).

VYHODNOCENÍ

- Spočítejte aktivitu PAL v čase 0h, 6h a 24h po aplikaci cryptogeinu a kontrolního vzorku (vody).
- Výsledky vynesete do grafu, kde budou srovnány změny aktivity PAL po aplikaci cryptogeinu ve srovnání s kontrolou (voda) v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.