

Jméno a UČO:

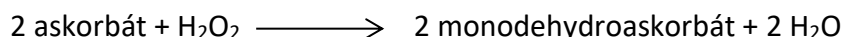
Datum:

# ÚLOHA A

## Analýza izoenzymů askorbát peroxidasy (APX) pomocí nativní PAGE a aktivity phenylalanin amoniak-lyasy (PAL)

### TEORETICKÝ ÚVOD

V rostlinných buňkách je hlavním detoxikačním systémem peroxidu vodíku askorbát-glutathion cyklus, ve kterém hraje klíčovou roli enzym askorbát peroxidasa (APX) katalyzující přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu za použití askorbátu jako specifického donoru elektronů:



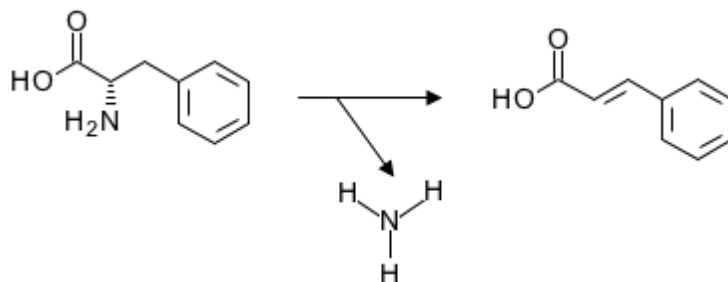
V odlišných částech buňky, jako jsou chloroplasty, mitochondrie, peroxisomy a cytosol, jsou přítomné různé izoformy APX. Expres jednotlivých genů APX je regulována jak v rámci biotického, tak abiotického stresu a dále poté v rámci vývoje rostlin. Aktivita APX se tak přímo podílí na ochraně rostlinných buněk před nepříznivými environmentálními podmínkami. Vlastní úloha enzymu APX v rámci obranné reakce rostlin je poté podpořena celou řadou výsledků ukazujících nárůst nebo naopak její aktivity v rámci infekce rostliny patogenem. Výrazný pokles její aktivity je poté většinou spojen s nekrotizací buněk způsobenou převážně oxidačním stresem.

Využití nativní polyakrylamidové elektroforézy pro stanovení aktivit celé řady enzymů má převážně největší význam při studiu aktivace jednotlivých izoenzymových forem. Sledování aktivity APX je založeno na její schopnosti zabránit askorbát-dependentní redukci nitroblue tetrazolia v přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  a N,N,N',N'-tetraethylendiaminu (TEMED) na nerozpustný barevný formazan. Výsledná aktivita APX je tak pozorována na gelu jako achromatický proužek. Tato metoda je velmi citlivá a (detekce méně než 0,01 jednotek APX) a specifická pro měření aktivity APX.

V rostlinné buňce existují tři základní regulační enzymy účastníci se syntézy fytoalexinů, phenylalanin amoniak-lyasa (PAL), 5-epiaristolochin syntasa (EAS) a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductasa (HMGR). Aktivace enzymu PAL (EC: 4.3.1.5) je spojena s akumulací

## Úloha A – Analýza izoenzymů APX a aktivity PAL

fenylpropanoidních látek a se syntézou důležité signální molekuly, kyseliny salicylové. PAL katalyzuje reakci přeměny aminokyseliny L-phenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou:

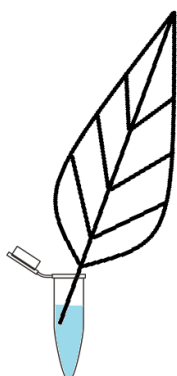


Aktivita PAL se dá velmi dobře měřit nárůstem absorpance kyseliny trans-skořicové při 290nm.

### POSTUP PRÁCE

#### *Infiltrace neznámého vzorku do listu tabáku*

Jednotlivé skupiny obdrží roztoky neznámého vzorku pro nasátí skrze listovou petiolu. Pro infiltraci skrze petiolu napipetujte cca 300  $\mu$ l neznámého vzorku do malé 0.2ml eppendorfky a seříznutý list nechte nasát tekutinu z eppendorfky (viz. obrázek 1) po dobu cca 30 minut. Poté přendejte list do vody a inkubujte 24 hodin.



**Obrázek 1:** Přímá infiltrace neznámého vzorku skrze petiolu

#### *Izolace askorbát peroxidasy*

1. Odeberte 0,3 g rostlinného pletiva po 24 h inkubaci s neznámým vzorkem a rozdrťte ho v tekutém dusíku.
2. Následně přidejte 0,6 ml izolačního pufru (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA) a dobře zvortexujte.

## Úloha A – Analýza izoenzymů APX a aktivity PAL

3. Homogenát centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C.
4. **Supernatant** přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C.
5. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

### Izolace phenylalaninamoniak lyasy

1. Odeberte 0,3 g rostlinného pletiva po 24 h inkubaci s neznámým vzorkem a rozdrťte ho v tekutém dusíku.
2. Následně přidejte 0,6 ml izolačního pufru (0,1 M Borát (pH= 8.8), 17 mM β-merkptoethanol, 1 % PVP) a dobře zvortexujte.
3. Homogenát centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C.
4. **Supernatant** přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C.
5. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

### Příprava polyakrylamidového gelu

1. Gel propláchněte vodou, vložte do elektroforetické vany a přilijte elektroforetický pufr obsahující 2 mM askorbát.
2. Spusťte elektroforézu na 30 minut při konstantním proudu 15 mA/gel. Elektroforézu provádějte při 4°C.

### Příprava a nanesení vzorků

1. Smíchejte 60 μl enzymového izolátu askorbát peroxidasy s 12 μl nanášecího pufru (50% Glycerol, 0.05% Bromfenolová modř).
2. Na gel nanášejte 15 μl jednotlivých izolátů
3. Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4 °C.

### Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě.

1. Ekvilibrujte gel 5 minut v 20 ml ekvilibračního pufru I (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 2mM askorbát).
2. Poté inkubujte gely 10 minut v 20 ml ekvilibračního pufru II, do kterého přidejte 6 μl peroxidu vodíku.
3. Poté gel promyjte 1 minutu v 20 ml promývacího pufru (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0)) a ponořte ho do detekčního pufru (50 mM fosfátový pufr (pH=7.8), 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT). Aktivita askorbát peroxidasy bude detekována jako achromatický proužek na tmavém pozadí.

# Úloha A – Analýza izoenzymů APX a aktivity PAL

## Měření aktivity enzymu *phenylalanin amoniak-lyasy*

### *Roztoky:*

0,1M Borátový pufr (pH = 8.8)  
12 mM L-Phenylalanine

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

0,1M Borátový pufr (8.8) 150  $\mu$ l  
12 mM L-Phenylalanin 150  $\mu$ l

Jako blank použijeme následující reakční směs:

0,1M Borátový pufr (8.8) 150  $\mu$ l  
12 mM D-Phenylalanin 150  $\mu$ l

Poté přidejte do každé zkumavky 125  $\mu$ l enzymového extraktu a inkubujte 30 minut při 30°C. Následně reakci zastavíme přidáním 150  $\mu$ l 0,1M TCA. Směs důkladně promíchejte na vortexu a do každé zkumavky přidejte 125  $\mu$ l 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

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci jednotlivých látek v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.
  
- Spočítejte aktivitu phenylalanin amoniak-lyasy (PAL) v čase 24h po aplikaci neznámého vzorku v pmol/s na mg rostlinného pletiva.
- Výsledky vynesete do grafu, kde budou srovnány změny aktivity PAL po aplikaci vašeho neznámého vzorku s kontrolou (voda).
- Výsledek zdůvodněte.