

Způsoby purifikace rekombinantního proteinu p53 z *E.coli*

MARIE BRÁZDOVÁ

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; tel: 05/41517176, e-mail: maruska@ibp.cz

Úvod

Protein p53 je nádorový supresor. Za normálních okolností se vyskytuje v buňce jen v malém množství, ale za stresových podmínek (poškození DNA vyvolané např. UV zářením) se jeho hladina výrazně zvýší. Působí jako transkripční faktor, který díky své sekvenčně specifické vazbě aktivuje expresi mnoha genů důležitých pro zastavení buněčného cyklu (tím umožňuje buňce opravit poškození) nebo v případě rozsáhlého poškození vyvolává programovatelnou smrt buňky - apoptosu (Oren and Rotter 1999).

V naší laboratoři se zabýváme studiem vazby tohoto proteinu na superhelikální DNA (Paleček et al. 1997). K našemu studiu preferenční vazby na tuto formu DNA využíváme lidský protein p53 izolovaný jednak z eukaryotického systému hmyzích buněk a především z prokaryotického bakteriálního systému *E.coli*.

Možnosti izolace rekombinantního proteinu p53 z *E.coli*

a. Výběr bakteriálních vektorů

Pro získání velkého množství rekombinantního proteinu můžeme využít řadu expresních vektorů se silnými promotory (Studier et al. 1990) pro *E. coli*. Specifikaci proteinů odvozených z proteinu p53 ukazuje tab.1. Jsou zde uvedeny typy vektorů, obsah aminokyselin (AA) proteinu p53, případně fúzní doména, molekulová hmotnost (Mr), teoretický isoelektrický bod (pI).

typ vektoru	konstrukt (AA)	Mr	pI	fúzní doména
pT7-7	p53fl (1-393)	43653	6,33	-
pET3d	p53CD(94-312)	24550	8,83	-
pGEX-2TK	GST320-393	34659	8,62	GST
	GST	25498	6,32	-
	320-393	9161	9,91	-

Tab. 1. Použité konstrukty

b. Pěstování bakteriální kultury a indukce tvorby rekombinantního proteinu

Různé přístupy k pěstování a purifikaci rekombinantního proteinu p53 a konstruktů od něho odvozených shrnuje tab. 2. Nám se zatím pro izolaci proteinů z vektorů pT7-7 a pET3d jako nejlepší osvědčil postup inspirovaný Pavletichem (Pavletich et al. 1993). Pro stabilní udržení plazmidu a pro zvýšení produkce rozpustného proteinu jsme kultivaci prováděli při teplotě 18°C a indukovali produkci proteinu dvakrát. Buňky byly nejdříve kultivovány do $OD_{600}=0,25$, pak jsme zahájili slabou indukci 0,05mM IPTG a po 8-12 hodinách (při $OD_{600}=1,1-1,4$) jsme indukovali podruhé, tentokrát silněji 0,4mM IPTG 8-12 hodin. Za těchto podmínek se zvláště p53CD tvořil v rozpustné formě z více než 50%. Pro indukci konstruktů ve vektoru pGEX-2TK (Pharmacia) jsme vy-

zkoušeli jednak postup doporučený manuálem GST Gene Fusion System (Pharmacia) a také náš výše zmíněný postup. Způsob kultivace a indukce při použití tohoto vektoru výrazně neovlivnil vysokou produkci rozpustného proteinu.

c. Purifikace proteinů

Kapalinová chromatografie umožňuje purifikaci rekombinantního proteinu na základě jeho náboje (iontoměničovou), specifické interakce (afinitní) nebo rozdílné velikosti (permeační chromatografie). Zmíněné přístupy jsme využili pro co nejkvalitnější purifikaci různých delečních konstruktů proteinu.

Purifikace centrální domény proteinu p53 (p53CD, 94-312 AA)(Pavletich et al. 1993) využívá odlišného náboje této domény ($pI= 8.83$), DNA a většiny záporně nabitých proteinů při vhodném pH pufru na koloně Q-Sepharose Fast Flow (anex). Získaný extrakt jsme nanесли na katex Mono S (s vysokým rozlišením), z kterého byl protein eluován 250mM NaCl (získaný vzorek byl přečištěn asi na 90 a více %). Vzorek po přesrážení sulfátem amonným a gelové permeační chromatografii na koloně Superdex 75 měl 99-100% čistotu.

Celý protein p53fl (fl= z anglického full length) jsme izolovali na HiTrap Heparin koloně (Hupp et al., 1992). Separace na tomto nosiči je založena převážně na afinitní interakci heparinu s proteiny vázajícími se na DNA, mezi které protein p53 patří (heparin simuluje strukturu DNA). Kolona byla vhodná pro separace z lyzátů, které obsahují velké množství rozpustného rekombinantního proteinu, ale při izolaci z bakteriálního lyzátu proteinu exprimovaného z pT7-7Hup53 vektoru jsme dostali vzorek jen o 40-60 % čistotě. Pro další purifikaci jsme použili po přesrážení sulfátem amonným kolonu Superdex 200. Separace na této koloně poskytla vzorek o 60-80% čistotě.

Tab. 2. Shrnutí kultivačních a izolačních přístupů

vybrané postupy kultivace			faktory						
typ vektoru	konstrukt	autor	T [°C]	IPTG[mM]	počet indukci	doba indukce	čistota	stav proteinu	purifikace (kolony)
pT7-7	p53fl	(Midgley et al., 1992)	37°C	0,5 (OD ₆₀₀ = 0,4)	1	2h		nerozp.	solubilizace guanidiniumchloridem, DEAE BioGelA (to)
pT7-7	p53fl	(Hupp et al., 1992)	21°C	0,5(při OD ₆₀₀ = 0,3)	1	4h	50-90%	2% rozp.	Heparin Sepharose, Superose 12
pGEX	p53flGST	(Smith and Johnson, 1988)	37°C	0,1	1	3-7h			glutathione-agarose
pGEX	fuzní protein s GST	GST Gene Fusion System	20-30°C	0,1-1 (OD ₆₀₀ = 0,5-2)	1	2-6h			HiTrap GST
pET3d	p53 (102-292)	(Pavletich et al., 1993)	RT	0,05 (OD ₆₀₀ = 0,25) 0,4(OD ₆₀₀ = 1)	2	16-24 h	99%	>50% rozp.	Mono S Superdex 75
pT7-7	p53fl	Brázdová	18°C	dle Pavletiche	2	16-24 h	60-80%		HiTrapHeparin Superdex 200
pGEX-2TK	GST320-393	Brázdová	RT	0,5 (OD ₆₀₀ = 0,5)	1	12h	99-100%	>50% rozp.	HiTap GST, Superdex 200 HiTapHeparin, Mono S
pET3d	p53CD	Subramanian Brázdová	18°C	dle Pavletiche	2	16-24 h	99-100%	>50% rozp.	Q-Sepharose Mono S Superdex 75

C-koncovou doménu proteinu p53 (320-393AA) jsme měli k dispozici jako fusní protein s GST (glutathion S-transferasa) v pGEX-2TK vektoru. Fusní protein jsme izolovali na HiTrap Heparinové koloně. Získali jsme vzorek o 85% čistotě. GST byl odštěpen sekvenčně specifickou proteasou trombinem a odstraněn na MonoS, získali jsme protein o 99 % čistotě. Protein GST320-393 jsme purifikovali také doporučeným postupem přes HiTrapGST kolonu, kdy jsme získali po jednom purifikačním kroku z 95% čistý fusní protein. GST po odštěpení byl odstraněn na HiTrap GST. C-koncová doména proteinu byla přečištěna na Superdexu 200. Získali jsme protein o 99-100% čistotě mnohem jednodušším způsobem. Pro detekci odštěpení fusní domény GST jsme kromě SDS-PAGE a imunodetekce s výhodou použili elektrochemii. Shrnutí poskytuje tab. 2. Všechny purifikace jsme prováděli na FPLC systému firmy Pharmacia a také použité kolony byly dodány touto firmou.

Perspektivy

Pro purifikaci rekombinantního proteinu p53 a jeho domén jsou vhodné expresní vektory se silnými promotory (pGEX a pET3d). Pro purifikaci celého proteinu p53fl budeme hledat kromě afinitní chromatografie na heparinové koloně a gelové permeační chromatografie ještě vhodnější separační krok. Zdá se nám zajímavá afinitní chromatografie s kovalentně navázanou protilátkou proti p53 a separace na základě náboje proteinu.

Práce vznikla při řešení úkolu podporovaného grantem GA ČR 301/99/0692.

Literatura

- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-86.
- Midgley, C. A., Fisher, C. J., Bartek, J., Vojtesek, B., Lane, D., and Barnes, D. M. (1992). Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*. *J Cell Sci* 101, 183-9.
- Oren, M., and Rotter, V. (1999). Introduction: p53-the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 55, 9-11.
- Palecek, E., Vlk, D., Stankova, V., Brazda, V., Vojtesek, B., Hupp, T. R., Schaper, A., and Jovin, T. M. (1997). Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene* 15, 2201-9.
- Pavletich, N. P., Chambers, K. A., and Pabo, C. O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 7, 2556-64.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185, 60-89.

Kapilární elektroforesa biologicky aktivních látek

PAVEL COUFAL A JANA SUCHÁNKOVÁ

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie
Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Kapilární elektromigrační separační metody jsou moderní separační techniky využívající k separaci látek elektrické pole. Vlastní separace se provádí v křemenné separační kapiláře o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů. Kapilární elektromigrační separační metody se vyznačují především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace, velkou rychlostí analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Menší reprodukovatelnost a trochu nižší citlivost ve srovnání s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) patří k hlavním nevýhodám těchto separačních technik.

Mezi kapilární elektromigrační separační metody řadíme šest technik. Kapilární zónovou elektroforesu (CZE = *Capillary Zone Electrophoresis*), která je vhodná pro separaci molekul s nábojem, iontů, lišících se svou molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Kapilární gelovou elektroforesu (CGE = *Capillary Gel Electrophoresis*) umožňující dělení vysokomolekulárních biologicky aktivních látek, jako peptidů, bílkovin, štěpů DNA a RNA. Micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií (MECC, MEKC = *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*) využívající micel vytvářených povrchově aktivními látkami, tensidy, které se s výhodou používá pro separaci neutrálních molekul i iontů. Elektrochromatografií v naplněných kapilárách (EC, CEC = *Capillary Electrochromatography*), jež kombinuje elektroforetický a chromatografický separační mechanismus a umožňuje dělení neutrálních i nabitých molekul. Kapilární isoelektrické fokusování (CIEF, IEF = *Capillary Isoelectric Focusing*), které dělí látky amfolytické povahy (tj. látky, které mohou nést kladný, záporný nebo žádný náboj podle pH okolního prostředí) v lineárním gradientu pH. Kapilární isotachoforesu (CITP, ITP = *Capillary Isotachopheresis*), jež separuje ionty podle rozdílných elektroforetických mobilit. S kapilární zónovou elektroforesou a ostatními elektromigračními metodami se může čtenář podrobněji seznámit v další literatuře (Kašička 1997), (Coufal 1999) a (Foret et al. 1993).

V tomto příspěvku se budeme zabývat pouze kapilární zónovou elektroforesou, tedy nejjednodušší elektromigrační separační metodou umožňující separaci a stanovení jak anorganických iontů (například Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , PO_4^{3-} , atd.), tak i organických látek s nábojem, tedy slabých organických kyselin či zásad, které mohou disociovat nebo být protonizovány (například kyselina benzoová, kyselina citronová, tyramin a další).

Separace látek neboli analýza v CZE se provádí v kapiláře z taveného křemene, která má vnější průměr 375 μm a vnitřní průměr 50, 75 nebo 100 μm . Tato křemenná kapilára je na vnějším povrchu pokryta vrstvou polyimidu o tloušťce několika mikrometrů, čímž se značně zvýší pružnost a odstraní křehkost kapiláry a my ji můžeme ohýbat, aniž by se zlomila.

CZE využívá dvou transportních jevů, elektroforetické migrace iontů v elektrickém poli a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou.

Elektroforetickou migrací iontů rozumíme pohyb iontů v elektrickém poli vlivem elektrostatického přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě. Konstantní elektroforetická rychlost $v_{ef,i}$ [$m \times s^{-1}$], kterou se i -té ionty pohybují v homogenním elektrickém poli k elektrodě s opačným nábojem, je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E [$V \times m^{-1}$] a elektroforetické pohyblivosti neboli mobilitě daného iontu $m_{ef,i}$ [$m^2 \times V^{-1} \times s^{-1}$].

$$v_{ef,i} = m_{ef,i} \cdot E \quad (1)$$

Intenzitu elektrického pole E uvnitř separační kapiláry vypočítáme jako podíl napětí U [V] vloženého mezi elektrody a celkové délky kapiláry l_c [m].

$$E = \frac{U}{l_c} \quad (2)$$

Ionty různých poloměrů nesoucí různé náboje vykazují v homogenním elektrickém poli různé elektroforetické pohyblivosti $m_{ef,i}$, které jsou přímo úměrné velikosti náboje iontu a nepřímo úměrné poloměru iontu a viskozitě okolního prostředí. V CZE vyjadřujeme pohyblivost nejčastěji v jednotkách [$cm^2 \times V^{-1} \times s^{-1}$]. Použijeme-li tuto jednotku, jsou elektroforetické pohyblivosti iontů řádově 10^{-4} s tím, že elektroforetické pohyblivosti a elektroforetické rychlosti kationtů jsou kladné a elektroforetické mobility a elektroforetické rychlosti aniontů jsou záporné.

Druhým transportním jevem, jenž je využíván v CZE, je elektroosmotický tok kapaliny křemennou kapilárou. Elektroosmotický tok (EOF = *electroosmotic flow*) neboli elektroosmosa je tok kapaliny kapilárou, v níž je vytvořeno elektrické pole vložením napětí desítek kilovoltů mezi elektrody na koncích kapiláry. Naplníme-li kapiláru z taveného křemene roztokem vhodného elektrolytu, dochází k disociaci křemičitano-ových (silanolových) skupin na vnitřní stěně kapiláry. Vnitřní povrch kapiláry tak získává negativní náboj a uvolňované vodíkové protony vytvářejí pozitivně nabitou vrstvu v roztoku přilehlém k vnitřní stěně kapiláry. Po vložením elektrického napětí mezi elektrody na koncích kapiláry dochází k pohybu hydratovaných vodíkových protonů, uvolněných z vnitřní stěny kapiláry, ve vzniklém elektrickém poli směrem ke katodě. Tyto vodíkové protony obalené molekulami vody strhávají veškerý roztok uvnitř kapiláry s sebou směrem ke katodě, čímž vzniká elektroosmotický tok. Lineární rychlost elektroosmotického toku v_{eof} [$m \times s^{-1}$] je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E uvnitř kapiláry a přes elektroosmotickou mobilitu m_{eof} [$m^2 \times V^{-1} \times s^{-1}$] závisí na velikosti negativního náboje, který se vytvořil na vnitřní stěně kapiláry disociací silanolových skupin.

$$v_{eof} = m_{eof} \cdot E \quad (3)$$

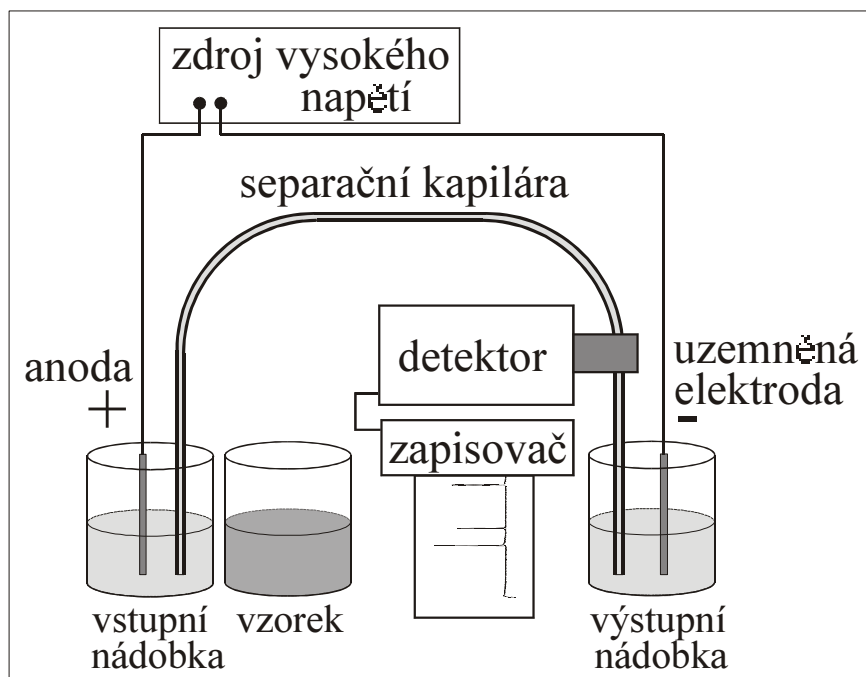
Čím je vyšší pH roztoku uvnitř kapiláry (tedy pH separačního pufu), tím větší negativní náboj je rozprostřen po vnitřní stěně kapiláry, a tím rychlejší elektroosmotický tok pozorujeme. Naplníme-li separační kapiláru 20 mM tetraboritanem sodným o pH= 9,1,

dosáhneme elektroosmotické mobility zhruba $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. S tímto pufrům v kapiláře o celkové délce 0,5 m s vloženým napětím 30 kV mezi elektrody budeme pozorovat elektroosmotickou rychlost zhruba $3 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$.

Kapalina tekoucí díky elektroosmose kapilárou vykazuje téměř rovný rychlostní profil, který vede k velmi malému rozmývání zón separovaných látek, a proto se v CZE setkáváme s mnohem užšími píky než v HPLC.

Během CZE analýzy je separačním pufrům uvnitř kapiláry veden elektrický proud, který dosahuje desítek mA. Elektrický výkon, který je dán součinem elektrického proudu protékajícího kapilárou a elektrického napětí vloženého na elektrody, se mění na Jouleovo teplo, které je odváděno stěnou kapiláry do okolního prostředí. Aby nedocházelo k přehřívání separační kapiláry během analýzy, je kapilára v komerčních přístrojích chlazena vzduchem nebo kapalinou.

Uspořádání přístroje pro CZE je schématicky znázorněno na obr. 1. S přístrojem vyobrazeným na tomto obrázku lze provádět všech šest výše jmenovaných kapilárních elektromigračních separačních metod.



Obr. 1. Schéma přístroje pro kapilární elektroforesu.

Při analýze vzorku kapilární zónovou elektroforesou se nejprve vstupní nádobka, separační kapilára a výstupní nádobka naplní vhodným separačním pufrům. Nejběžněji používaným pufrům je 20 mM tetraboritan sodný o $\text{pH} = 9,1$. Před vlastní analýzou se na platinové elektrody ve vstupní a výstupní nádobce vloží na dobu několika minut (např. 15 minut) napětí několika desítek kilovoltů (např. 20 kV), aby se stabilizoval EOF v kapiláře a vnitřní povrch kapiláry si přivykl na používaný pufr. Poté se provede dávkování vzorku, při němž se vstupní nádobka vymění za nádobku se vzorkem a na elektrody se připojí dávkovací napětí několika jednotek kV na dobu několika sekund

(např. 5 kV na 6 sekund). Během dávkování se pomocí elektrosmosy nasaje malé množství vzorku do vstupního konce kapiláry, jehož objem bývá jednotky až desítky nanolitů. Dávkování vzorku pomocí vloženého napětí mezi elektrody se nazývá elektrokinetické dávkování. Kromě elektrokinetického dávkování se mnohem častěji používá hydrodynamické dávkování vzorku. Při hydrodynamickém dávkování vzorku se nádobka se vzorkem s ponořenou kapilárou a elektrodou hydrodynamicky uzavře a nad hladinu vzorku se přivede stlačený vzduch o tlaku několika desítek milibarů po dobu několika sekund (např. 10 mbar po dobu 5 sekund). Přetlak nad hladinou vzorku natlačí malé množství vzorku o objemu několika nanolitů do vstupního konce separační kapiláry. Hydrodynamický způsob má tu výhodu, že nadávkuje do kapiláry vzorek o stejném složení, jaké je složení vzorku v nádobce. Naproti tomu elektrokinetický způsob nadávkuje do kapiláry vzorek o odlišném složení než složení vzorku v nádobce, neboť při tomto způsobu dávkování jsou zvýhodněny kationty a znevýhodněny anionty díky svým elektroforetickým rychlostem.

Po nadávkování vzorku se vstupní konec kapiláry a elektroda opět ponoří do vstupní nádoby se separačním pufrem a připojením napětí několika desítek kilovoltů (např. 20 kV) na elektrody se spustí vlastní analýza vzorku. Po připojení separačního napětí je celá zóna vzorku unášena elektrosmotickým tokem separačního pufru směrem ke katodě, tedy k detektoru. Látky s nábojem navíc migrují svými elektroforetickými rychlostmi uvnitř separačního pufru a vytvářejí v kapiláře vlastní zóny. V původní zóně vzorku zůstávají všechny neutrální látky ve vzorku přítomné, a tudíž nedochází k jejich separaci. CZE je proto nepoužitelná pro separaci a analýzu směsi neutrálních látek. Bude-li se ve vzorku nacházet více druhů kationtů a více druhů aniontů, které se budou lišit svými elektroforetickými mobilitami, a tedy i elektroforetickými rychlostmi, budou vytvářet vlastní zóny pohybující se rozdílnými pozorovanými rychlostmi a dospějí do detektoru v různých migračních časech. Zóny všech kationtů dorazí do detektoru před zónou neutrálních látek a zóny všech aniontů se objeví v detektoru až za zónou neutrálních látek.

V CZE se nejčastěji používá absorpční fotometrický detektor pracující v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Detektor umístěný poblíž výstupního konce separační kapiláry (viz. obr. 1) měří absorbanci roztoku v separační kapiláře v místě detektoru při dané vlnové délce. Objeví-li se v kapiláře v místě detektoru zóna nějaké analyzované látky, která absorbuje záření při zvolené vlnové délce, detektor ji zaznamená a nám se tato zóna objeví na záznamu analýzy, kterému říkáme elektroferogram, jako pík odpovídající dané absorbující zóně. Počet separovaných zón analyzovaných látek prošlých detektorem pak odpovídá počtu píků v elektroferogramu. Na svislé ose elektroferogramu je vynesena odezva detektoru odpovídající absorbanci příslušné zóny a na vodorovné ose se nachází migrační čas zóny příslušné látky, což je doba, která uplyne od počátku analýzy do okamžiku, kdy se zóna dané látky objeví v detektoru.

Elektroferogram, který je obrazem zón separovaných látek vzniklých během CZE analýzy v separační kapiláře, je zdrojem kvalitativní a kvantitativní informace o analyzovaných látkách. Poloha píku v elektroferogramu jednoznačně udává migrační čas příslušné sloučeniny, z něhož lze vypočítat elektroforetickou pohyblivost příslušné ana-

lyzované látky a tato elektroforetická pohyblivost udává druh analyzované látky; je tedy kvalitativní informací o analyzované látce. Plocha píku v elektroferogramu je úměrná množství příslušné analyzované sloučeniny nadávkované do separační kapiláry a přes nadávkovaný objem vzorku jednoznačně udává koncentraci analyzované látky ve vzorku. Plocha píku nese tudíž kvantitativní informaci o analyzované sloučenině. Pro kvantitativní vyhodnocování elektroferogramů se nejčastěji používá metoda kalibrační přímky.

Kapilární elektroforesu lze využít k separaci a stanovení nejrůznějších biologicky aktivních sloučenin, jako nižších mastných kyselin (Arellano et al. 2000), aminokyselin (Nishi et al. 1990), nukleosidů (Row et al. 1987), vitamínů (Nishi et al. 1989), bílkovin (Lauer et al. 1986) a extrahovaných barviv z rostlin (Weng et al. 2000).

Literatura

- Kašička V. 1997. - Chem. Listy **91**: 320.
Coufal P. 1999. - In: Helán V. (ed.): Analýza organických sloučenin 211. 2 THETA, Český Těšín, ISBN 80-902432-9-0.
Foret F., Křivánková L., Boček P. 1993. - Capillary Zone Electrophoresis. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, ISBN 3-527-30019-8.
Arellano M., Jomard P., Kaddouri S.E., Roques Ch., Nepveu F., Couderc F. 2000. - J. Chromatogr. B **741**: 89
Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M. 1990. - J. Microcolumn Sep. **2**: 234.
Row K.H., Griest W., Maskarinec M.P. 1987. - J. Chromatogr. **409**: 193.
Nishi H., Tsumagari N., Kakimoto T., Terabe S. 1989. - J. Chromatogr. **465**: 331.
Lauer H.H., McManigill D. 1986. - Anal. Chem. **58**: 166.
Weng W.-Ch., Sheu S.-J. 2000. - J. High Res. Chromatogr. **23**: 143.

Rekombinantní protilátky scFv (*single-chain variable fragments*) - nový přístup k sérologické detekci rostlinných patogenů

NOEMI ČEŘOVSKÁ A TOMÁŠ MORAVEC

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Na Karlovce 1a, Praha 6, 160 00,
tel.: 02/243 10 108, email: moravec@ueb.cas.cz

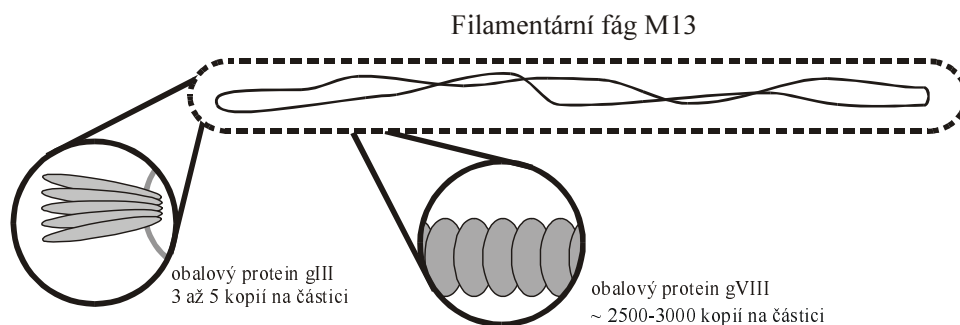
Princip metody

V současné době se pro sérologickou detekci rostlinných patogenů, včetně virů, používají jak polyklonální, tak monoklonální protilátky (Mabs). Použití monoklonálních protilátek je upřednostňováno, protože zajišťují konstantní přísun protilátky o přesně určených vlastnostech. Ale příprava Mabs je časově náročná, velmi drahá, vyžaduje speciální vybavení pro jejich přípravu a skladování.

Poslední dobou se i do rostlinné virologie rozšiřuje nová metoda přípravy specifických protilátek v bakteriích pomocí fágových peptidových knihoven (*phage display libraries*).

Phage display libraries jsou konstruovány jednak z přirozených zdrojů, tzn. z neimunizovaných i imunizovaných dárců (*naive libraries*), jednak jako knihovny syntetické. Fragmenty protilátek se zobrazují na povrchu vláknitých fágů fusované nejčas-

těži ke genu III (gIII) pro g3 fágový protein (g3p) (viz obr. 1). Na konci vláknité fágové částice se vyskytuje 3 až 5 kopií g3p a fragmenty protilátek se zobrazují buď fusované k aminokonci přirozeného g3p, nebo k jeho o dvě aminokyseliny zkrácené verzi.

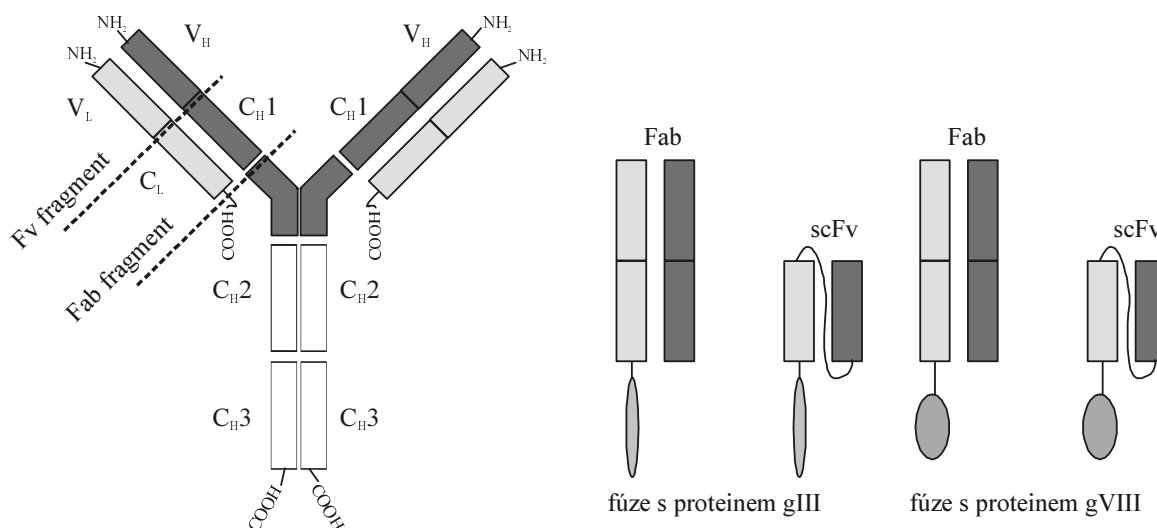


Ob. 1. Schematické znázornění stavby filamentárního fága M13. Fágová částice sestává z 2500 až 3000 kopií hlavního obalového proteinu gVIII, který chrání genom fága v podobě kružnicové ssDNA. Na koncích fágové částice je ještě několik kopií proteinu gIII, který umožňuje infekci bakterie. S tímto proteinem je fúzován scFv fragment protilátky v použité knihovně.

K získání fágových částic nesoucích protilátky se používají buňky, ve kterých lze fága množit, které se koinfikují pomocným fágem (helper fágem), který však také produkuje g3p. Z tohoto důvodu až 90% fágových částic nenese protilátku.

Forma exprimovaných protilátek

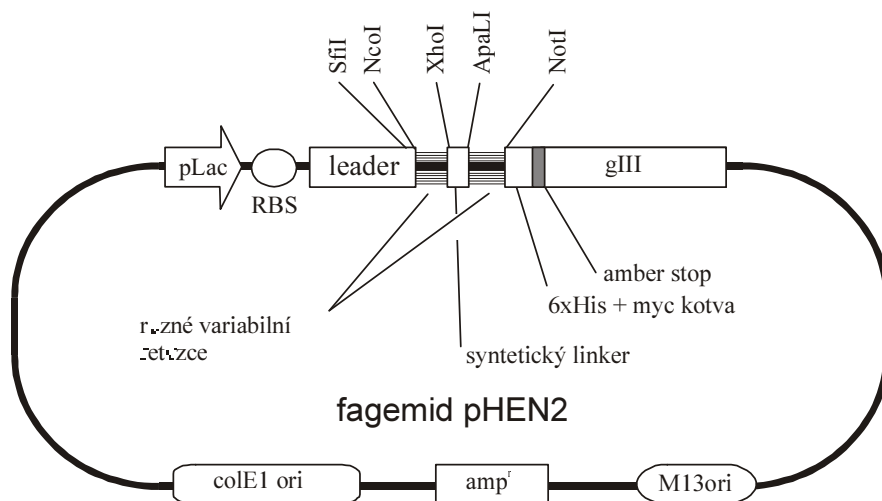
Protilátky se produkují buď ve formě jednořetězcových fragmentů variabilní části (scFv) nebo ve formě Fab fragmentů. Obě formy exprimovaných protilátek jsou monovalentní a použitelné pro detekci antigenů (viz obr.2.).



Obr. 2. Schematické znázornění stavby protilátky a protilátkových fragmentů fusovaných s fágovým proteinem gIII respektive gVIII.

Ve fragmentu scFv jsou variabilní oblasti z lehkých a těžkých řetězců spojeny peptidovým linkerem a scFv polypeptidové fragmenty jsou fúzovány na svém C-konci ke g3p. Fúze je provedena přes amber-stop kodón, který je ve vhodných buňkách potlačen a vzniká tak fúzní protein. Výhodou scFv je malá velikost jejich genů, což činí knihovnu

geneticky stabilní a usnadňuje to práci s ní. Fab fragmenty se fúzí každý zvlášť, tedy buď těžký nebo lehký řetězec cestou vazby na C-konec g3p a partnerský řetězec se exprimuje nefúzovaný. Po sekreci se oba řetězce se spojí v periplazmatickém prostoru. Klony kódující specifické fragmenty lze potom vybrat pomocí selekce za použití známých sérologických metod (ELISA, imunobloting).



Obr. 3. Struktura fagemidu pHEN2. Pod kontrolou promotoru Lac je vložen syntetický konstrukt scFv následovaný amber stop kodonem a gIII obalovým proteinem. Pro případnou purifikaci rozpustných protilátek jsou vloženy 6xHis a myc kotvy.

Laboratorní vybavení

Knihovna (Human Synthetic $V_H + V_L$ scFv) byla získána z Centre for Protein Engineering, Medical Research Council Centre, Cambridge, UK). Knihovna obsahuje více než 10^{10} klonů a byla konstruována in vitro pomocí PCR amplifikace sekvencí kódujících variabilní domény ($V_H + V_L$) z lidských imunoglobulinů a jejich reklonování do fágového vektoru pHEN2 (viz obr.3). Knihovna je dodávána s návodem na její pěstování.

Kultura helper fága M-13K07 byla získána od fy. Amersham Pharmacia Biotech. Dále je potřeba běžné vybavení a chemikálie na ELISA metody (doporučený je plast firmy Nunc- zkumavky Maxisorp)

Pracovní postup

Před prací s vlastní knihovnou je nutné se seznámit s pracemi nutnými pro namnožení knihovny. K seznámení s pracovním postupem slouží práce s klony pro pozitivní (TG1 buňky obsahující anti-thyreoglobulinový klon) a negativní kontrolou (TG1 obsahující pHN₂).

Dalším krokem je namnožení pomocného fága a připravení sekundární zásobní knihovny. V dalším dnu se již nechá narůst knihovna a potáhnou se zkumavky pro první selekci, ta se provede následující den. Izoluje se fág z první selekce a potáhnou se zkumavky pro selekci číslo dvě. V každém dalším selekčním kroku se testují namnožené a selektované fágy z kroku předchozího. Selekcí kroky se obvykle provádí tři až

čtyřikrát. Závěrečným krokem je ELISA provedená selektovaným fágem, kdy vazba fága se deteguje pomocí protilátky proti fágu M-13 konjugovaného s chromoforem. Popřípadě se selektovanými pHEN infikují buňky HB2151, které nedokážou potlačit amber-stop kodón a indukuje se exprese rozpustných fragmentů, které se detegují monoklonální protilátkou proti markeru myc.

Úskalí metody

Nejzávažnějším úskalím je redukce počtu klonů v knihovně. Vzhledem k tomu, že schopnost selektovat vysoce afinní protilátku je přímo závislá na velikosti knihovny, každé snížení počtu klonů může výrazně zhoršit dosažené výsledky.

Další nevýhodou je velikost exprimovaného fragmentu protilátky. Vzhledem k tomu, že jde pouze o Fv fragment (viz obr.2.), je tato molekula mnohem méně stabilní než je tomu u Fab fragmentů nebo dokonce u celé protilátky. Z toho plynou určitá omezení, například scFv fragment nelze použít jako první potahovou protilátku přímo na ELISA desku.

Dále je nutno zabránit jakémukoli úniku fága z kultivačních lahví a následné kontaminaci laboratoře. Samotné autoklávování lahví a nádobí je nedostatečné. Doporučuje se proto užívat jednorázový plast, jinak se musí všechny plast namočit na 1h do 2% roztoku chlornanu sodného, teprve potom následuje extensivní promývání a autoklávování. Nakonec se musí použité sklo sušit nejméně 4h při 200°C. Doporučuje se také užívat polypropylénové zkumavky, na kterých nedochází k nespecifické vazbě fága.

Srovnání s alternativními metodami

Hlavní výhodou užití fágových knihoven a selekce scFv pomocí fágového displeje je obejití problémů spojených s použitím slabých nebo toxických imunogenů, protože v tomto případě není metoda založená na imunitním systému. Další výhodou je rychlost generace protilátek (po zvládnutí metody asi 14 dní). ScFv mohou být fuzovány s velkým okruhem reportérových molekul, které usnadňují jejich použití jako imunodiagnostika (např. s alkalickou fosfatase). Nezanedbatelnou výhodou je rovněž to, že není nutné používat laboratorní zvířata.

Nevýhodou ve srovnání s klasickými metodami je poměrně nízká afinita protilátek, zvláště, jestliže se vychází z nativní knihovny z neimunizovaného dárce.

Literatura

- Protocol for use of the human synthetic VH + VL scFv library (Griffin.I Library)
 Griffiths, A. D. Williams, S. C. Hartley, O. Tomlinson, I. M. Waterhouse, P. Crosby, W. L. Kontermann, R. E. Jones, P. T. Low, N. M. Allison, T. J. Prospero, T. D. Hoogenboom, H. R. Nissim, A. Cox, J. P. L. Harrison, J. L. Zaccolo, M. Gherardi, E. and Winter, G, (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. EMBO J. 13, 3245-3260.
- Griffiths, A.D., Duncan, A.R. (1998), Strategies for selection of antibodies by phage display. Current opinion in biotechnology 9, 102-108.
- Toth, R.L. Harper, K, Mayo, M.A., Torrance, L. (1999), Fusion proteins of single-chain variable fragments derived from phage display libraries are effective reagents for routine diagnosis of potato leafroll virus infection in potato. Phytophology 89(11),1015-1021.

Cytokinin purification: new approaches on old grounds

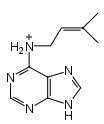
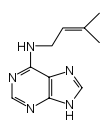
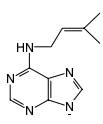
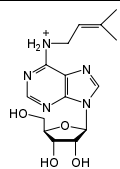
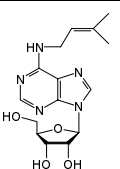
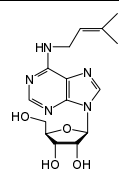
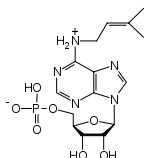
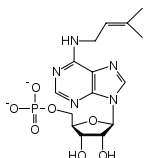
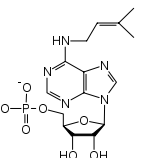
PETER DOBREV AND MIROSLAV KAMÍNEK

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha,
tel.: +420/2/203 90 444, email: dobrev@ueb.cas.cz

The determination of plant hormones in biological matrices requires thorough purification prior to final quantitation step. Plant extracts usually contain huge number of compounds at different quantities and plant hormones represent just a minute part of them. The common quantitation procedures, e.g. **radio-immuno assay (RIA)**, **enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)**, **gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)** or **high performance liquid chromatography – mass spectrometry (HPLC-MS)** are very selective and can be successfully applied to relatively not very pure samples. Nevertheless, there are many interfering substances that can distort the results of these methods. Nowadays requirements of fast and reliable analyses of sometimes very complex biological matrices put high demands on sample cleanup procedures preceding quantitation.

The development of extraction and purification procedures for cytokinins has been based on their chemical nature (1,2). From the three main chemical groups of cytokinins, bases, ribosides and nucleotides, the last are sensitive to extraction method due to the endogenous phosphatases in the biological extracts. In order to isolate intact nucleotides, organic extraction solvents of high acidity at low temperatures are used. These solvents efficiently precipitate the proteins, thus reducing their enzymatic activities. All

Tab. 1. Ionization states of cytokinins at different pH

Cytokinin types	pH 3	pH 7	pH 11
Bases O-glucosides			
Ribosides N-glucosides O-glucoside ribosides			
Nucleotides			

natural cytokinins are amenable of ionization under alternation of pH (Table 1).

This property of cytokinins can be exploited for their purification. By properly adjusting pH cytokinins can be purified by chromatography on cation- or anion-exchange columns. At low pH (<3), bases, ribosides and glucosides are retained on cation-exchanger, whereas nucleotides pass through. At neutral pH, anion-exchanger will retain

nucleotides, separating them from bases, ribosides and glucosides. At high pH (>11), cytokinin bases and nucleotides are retained on anion-exchanger.

Here we present fast and reliable purification procedure for cytokinins, that uses newly developed solid phase extraction (SPE) supports. Devising this procedure we pursued the following objectives:

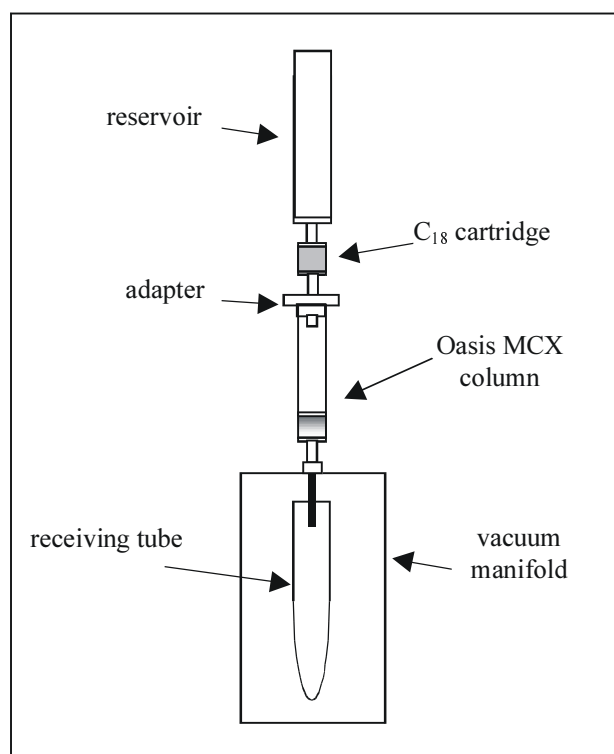
- to reach high recoveries of most cytokinins at final purified sample
- to use as few as possible purification and evaporation steps
- to obtain final preparation pure enough for analysis by any of the quantitation methods
- there should be high throughput of samples, with desirable automation of the procedure

Materials and Methods

The following solvent mixture, which suppresses phosphatases' activities is used for extraction: methanol / water / formic acid = 15/4/1 v/v/v. Plant tissue is grounded in liquid nitrogen and extracted in 5 ml of extraction mixture per 1 gram fresh weight overnight at -20°C . After centrifugation at 20000 rcf, 4°C for 20min the pellet is reextracted with additional 5ml of extraction mixture. The pooled supernatants are directly applied to the assembled set of SPE columns (scheme 1.). The first column in the set is reversed phase- C_{18} cartridge(360mg sorbent). All the cytokinins in the plant extract pass through this column, because of the high percent of organic solvent in the extraction mixture (75% methanol). However, the most hydrophobic interferences in the plant extract are retained. The second column in the set is the mixed hydrophobic-strong cation-exchange column Oasis MCX (150mg sorbent , Waters co., 3). Due to the high acidity of extraction solvent (5% formic acid), the cytokinin bases, ribosides and glucosides are positively charged and retained by ion-exchange mechanism on MCX. The cytokinin nucleotides, as well as other anions and neutral molecules pass through. The MCX column is washed with extraction mixture, followed by methanol. Cytokinin bases, ribosides and glucosides are eluted from MCX by 5ml 2,5% NH_4OH in 60% methanol.

Results and Discussion

When MCX columns were tested under the above conditions with more than 20 cytokinin standards the reco-



Scheme I. The purification set for cytokinins

veries were between 85-100%. The capacity of MCX column (150mg sorbent) for benzyladenine in extraction solvent was 6mg. The recoveries of cytokinins in real plant extracts were above 60% if 1 gram of fresh tissue or less was extracted.

The new column Oasis MCX allows direct isolation of cytokinins from the extraction mixture with good recoveries. This property of MCX eliminates the need of concentration of the plant extracts by evaporation. Another advantage is that the recoveries of retained compounds are not significantly decreased if the column runs dry. Thus there is no need of laborious monitoring of the levels of liquid above the column. This allows easy manipulation of high number of samples and automation of the procedure.

The purity of samples obtained by this new procedure allowed their direct application on analytical HPLC prior RIA or ELISA. For micro-HPLC-MS additional SPE-C₁₈ purification step is needed.

Acknowledgement: This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic and Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No 2006/96/K188 and OK292, respectively.

References:

- Horgan, R. and Scott, I.M. Cytokinins, in *Principles and practice of plant hormone analysis*, eds., Rivier, L. and Crozier, A., Academic Press, London, Vol. II, 303-365, 1987
- Yokota, T., Murofushi, N., Takahashi, N. Extraction, purification and identification. In *Hormonal Regulation of Development I. Molecular aspects of plant hormones*. Ed. MacMillan, in *Encyclopedia of Plant Physiology 9*, J., Springer-Verlag Berlin, 113-201, 1980
- Waters Chromatography Columns and Supplies Catalog 1999-2000

Izolace mitochondrií z rostlinného materiálu

TOMÁŠ HÁJEK

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha,
tel.: +420/2/203 90 451, email: hajek@ueb.cas.cz

Mitochondrie jsou jednou z hlavních organel rostlinné buňky. Jejich izolace od ostatního buněčného materiálu musí probíhat v osmoticky vhodném prostředí, nesmí být příliš dlouhá a nesmí docházet k porušení intaktnosti mitochondrií.

Vypracovali jsme proto rychlou a dostatečně přesnou metodu na izolaci mitochondrií z našeho materiálu tj. tkáňových kultur tabáku a pylových láček. Extrakční pufr v našich pokusech má základní složení dle Neuburgera (2) 0.3M manitol, 4mM cystein, 1mM EDTA, 20mM cocarboxylasa, 0,4mM PMSF + 5mg/ml Leupeptin, Pepstatin a Aprotinin. Homogenizace 0,2 - 1g filtrovaného materiálu probíhá rotací přítlačného síta s 1mm oky na sítu o hustotě 20 µm. Mezi síto a pod něj se dostane pouze rozdrčený materiál. Nerozdrčené buňky stále zůstávají na povrchu. Maximální doba drcení je 60 sec. Po 30 sec. jsou již plně rozdrčena např. pylová zrna tabáku. Výsledný homogenát se propláchně médiem a odpipetuje z podkladové fólie. Homogenát se pročistí od velkých částic centrifugací při 2000 x g - 5 min a 6000 x g - 10 min. Supernatant se nanese na Percollové médium a centrifuguje se na výkyvném rotoru 40 000 x g - 80 min. Ve svrchní části po centrifugaci se nachází vyčištěná cytoplazmatická frakce. Nažloutlý mitochon-

driální prsteneček se odebere ze středu vytvořeného gradientu. Suspenze se pod vodní vývěvou odsaje přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,2 mm a promyje médiem s 0,3M manitolem. Takto izolované mitochondrie lze nastříhat přímo do nanášecího pufru na libovolný typ elektroforezy resp. zamrazit v -70°C pro další použití. Průkazem vyčištění obou frakcí jsou výsledky např. z extrakce pylových láček. Na 2-D PAGE SDS elektroforese se takto získané cytoplasmatické a mitochondriální frakce svým proteinovým rozložením nepřekrývají. Isotopem značené mitochondriální proteiny tepelného šoku po použití této metody nelze detegovat v cytoplasmě.

Literatura:

M. Neuberger, E.P. Journet, R. Bligny, J.P. Carde and R. Douce :
Purification of plant mitochondria ...
Archives of Biochem and Biophys. Vol. 217 (312-323) 1982

Organická hmotnostní spektrometrie a její biologické aplikace

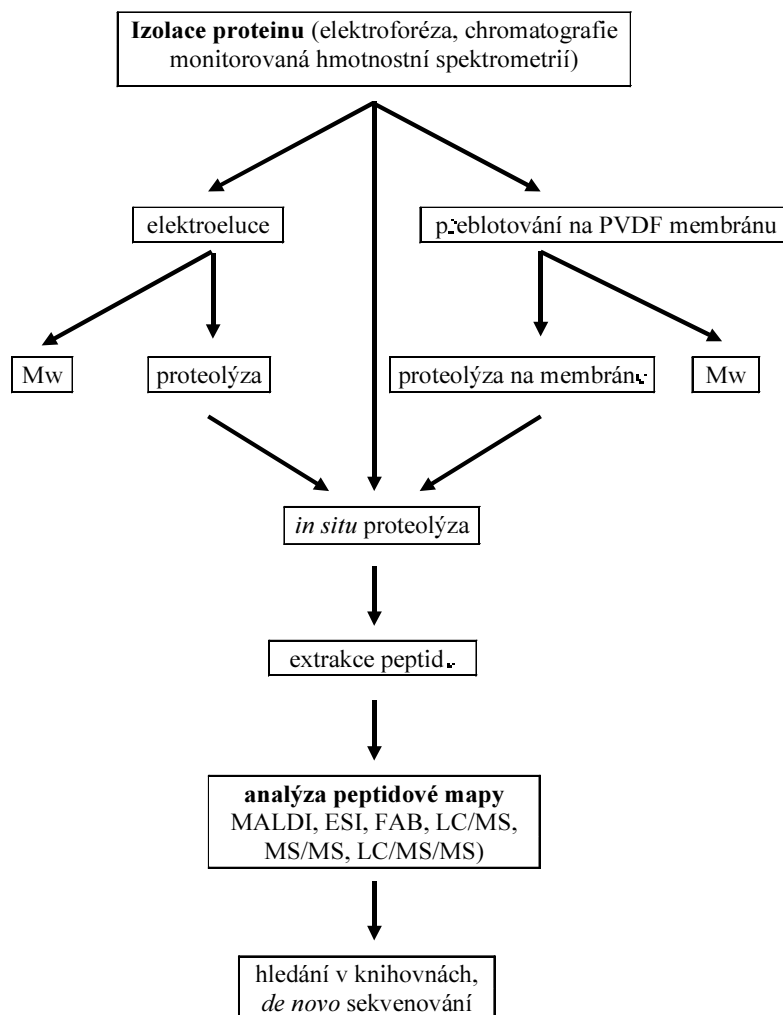
VLADIMÍR HAVLÍČEK

Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4,
tel.: 02/475 26 45, fax.: 02/475 27 49, e-mail: vlhavlic@biomed.cas.cz

Organická hmotnostní spektrometrie zaujala v průběhu posledního desetiletí zcela výsadní postavení mezi analytickými technikami používanými v biologických vědách. Důvody jsou prosté: metoda je nesmírně citlivá, specifická, rychlá a „umí“ pracovat i s velmi komplikovanými směsami. Tyto její vlastnosti způsobily, že např. dosud výhradní technika pro sekvenování peptidů a proteinů - Edmanovo odbourávání - začíná ustupovat do pozadí, protože nezvládá stanovit sekvenci peptidu na femtomolární koncentrační úrovni, případně pokud je N-konec peptidu blokován, nebo některá z aminokyselin posttranslačně modifikována.

První zajímavou vlastností hmotnostní spektrometrie je tedy velmi nízká mez detekce. Při ionizaci laserem za přítomnosti matrice (MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation*) na přístrojích s analyzátor z doby letu (TOF = *Time-of-flight*) jsou potřeba pouze femtomoly peptidu, abychom byli schopni zjistit během cca pěti minut jeho velmi přesnou molekulovou hmotnost. Při ionizaci elektrosprejem na iontové pastí se detekční limit propadá do oblasti attomolů (tedy 10^{-18} molu). Na tomtéž přístroji stačí k plnému určení sekvence peptidu již 30 fmol vzorku. Tím se dostáváme ke druhé fantastické vlastnosti hmotnostní spektrometrie - tj. k její specifitě: jsme schopni nejen měřit prosté hmotnosti, ale navíc získávat velmi detailní informace o kovalentní struktuře látek a někdy i částečné informace o vyšších strukturách (např. proteinů). Široký záběr v biologických aplikacích plyne z ohromné škály ionizačních metod, analyzátorů iontů a různých kombinačních technik, které má hmotnostní spektrometrie k dispozici. Hlavní z nich, „multidimensionální“ hmotnostní spektrometrie (MS^n) a metody kombinované s chromatografickou separací (LC/MS, GC/MS) budou během přednášky probrány detailněji. Třetí a čtvrtou kladnou vlastností hmotnostní spektrometrie

jsou její rychlost a schopnost poradit si s bohatou směsí. Např. za optimálních podmínek lze stanovit pořadí aminokyselin v proteinu o $M_r = 15\text{-}20\text{ kDa}$ během cca jednohodinové LC/MS/MS analýzy.



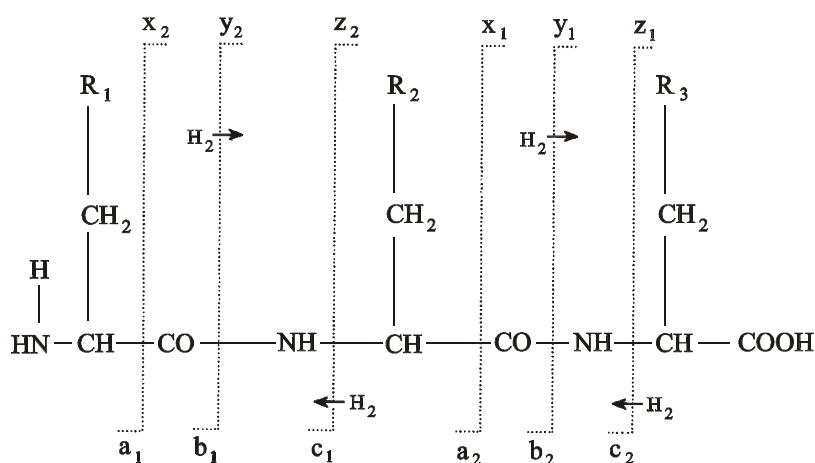
Obr. 1. Úplná charakterizace proteinů.

O tom, jak vypadá nejběžnější sekvenační hmotnostně-spektrometrický protokol, referuje obr. 1. Vyplývá z něj následující hlavní informace: nejprve je změřena hmotnost celé biomolekuly, která je následně enzymově nebo chemicky rozštěpena na menší části. Tyto jsou pak detailně charakterizovány (sekvenovány) a nakonec celá biomolekula je zpětně „sestavena“.

Změřit hmotnost celé molekuly „umí“ hmotnostní spektrometrie (na rozdíl od jiných metod) s extrémní přesností (0.1-0.01%) a její praktický hmotnostní limit se v současnosti pohybuje kolem 0.5 MDa. To je hodnota, kam se dostávají pulsní komerční spektrometry na principu MALDI-TOF (UV-laser). Při použití elektrospreje jako ionizační techniky na kvadrupólech či starších iontových pastech se horní limit pohyboval kolem 150 kDa a byl v rozhodující míře limitován konvenčním hmotnostním rozsahem přístroje (většinou do 4000 Da). Při ionizaci elektrosprejem dochází (v závislosti na počtu bazických/kyselých center) k násobné protonaci/deprotonaci molekuly a tudíž k ná-

sledné tvorbě vícenásobně nabitých iontů. Hmotnostní spektrum, jak známo, je závislostí intenzit jednotlivých iontových proudů na poměrech jejich hmotností k náboji (m/z). Je-li látka o molekulové hmotnosti např. 100 kDa nabitá padesátkrát, můžeme její $[M+50H]^{50+}$ ion pozorovat na m/z 2000, tedy v rozsahu většiny komerčních přístrojů. Dekonvoluční programy, které jsou běžnou součástí softwarového vybavení spektrometrů, pak vypočtou výslednou hmotnost biomolekuly, a to včetně přesnosti výpočtu. Nutno poznamenat, že současné moderní iontové pasti mají základní konvenční hmotnostní dosah již 20 kDa, a jejich reálný akční rádius tak začíná dohánět analyzátoři z doby letu (TOF).

Sekvenční informace se v případě peptidů nejčastěji získávají MS/MS experimentem (MS^2) na jednu nebo vícekrát protonovanou molekule. Uspořádání experimentu se samozřejmě liší podle typu použitého hmotnostního analyzátoru nebo jejich kombinací. MS/MS spektra se sice v literatuře uvádějí pod různými názvy (na TOF přístrojích se jedná o *Post-Source Decay* spektra, u analyzátorů s kolizní celou pak o *Collision-Induced Dissociation* spektra apod.), ve všech případech se avšak jedná o tzv. dceřiná spektra, která obsahují fragmentové (dceřiné) ionty, které vznikly rozpadem iontu rodičovského, v našem případě například protonované molekuly $[M+H]^+$ libovolného peptidu. Při ionizaci peptidu dochází k protonaci nejbazičtějšího místa v molekule. Často se jedná o atomy kyslíku v peptidových vazbách peptidů. Následně dochází k přesmyku protonu na amidický dusík CO-NH vazby a jejímu rozštěpení (Obr. 2).



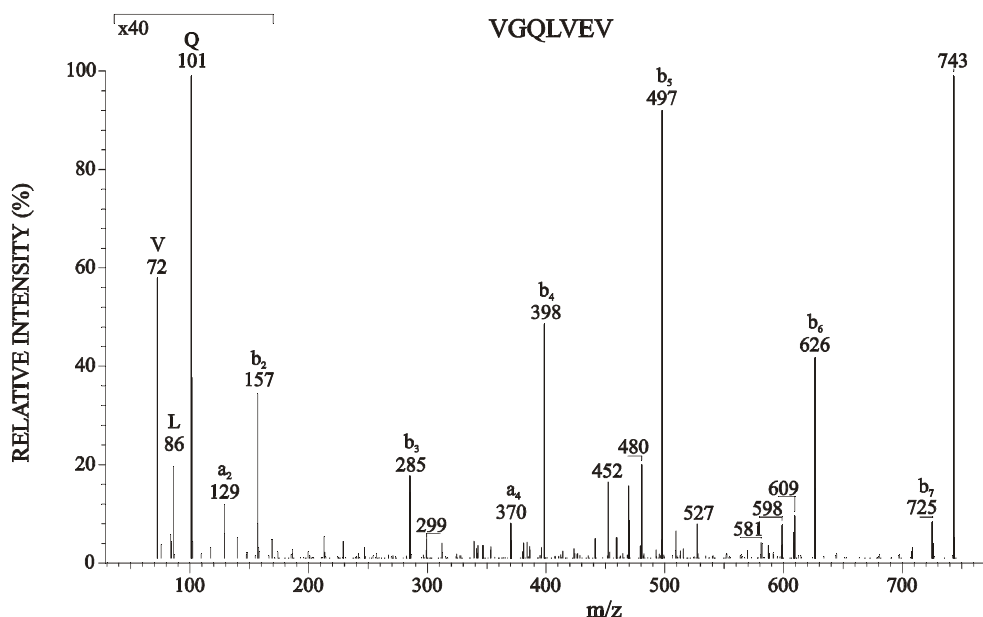
Obr. 2. Štěpení hypotetického tripeptidu. Spodní index iontových druhů definuje počet aminokyselinových zbytků, které jsou ve strukturách těchto iontů obsaženy.

Takto vzniká dvojice komplementárních iontů, které se podle hmotnostně spektrometrické nomenklatury označují jako ionty typu b_i (N-koncové ionty) a y_i (C-koncové ionty).

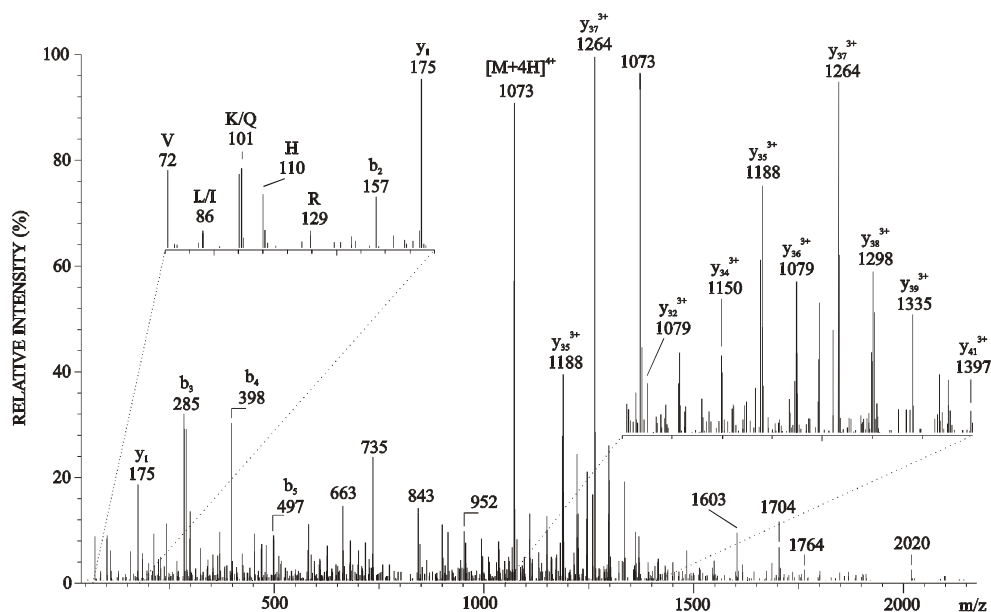
O tom, které iontové druhy budou přítomny v dceřiném spektru, rozhoduje stupeň nábojové lokalizace. V případě peptidu s výhradně hydrofóbními aminokyselinami dominují v MS/MS spektrech ionty typu b_i a výsledné spektrum je poměrně jednoduché (Obr. 3). V případě peptidu s větší molekulovou hmotností a kompletním spektrem aminokyselin je i odpovídající spektrum daleko složitější (Obr. 4). Ani v takovém pří-

padě netřeba zoufat: k dispozici jsou příslušné interpretační programy nebo specialisté oboru, na které lze možno se obrátit.

V rámci přednášky budou kromě základních moderních ionizačních technik (MALDI, elektrosprej) probrány hlavní sekvenční protokoly, dále postupy při určování typu posttranslačních modifikací (glykosylace, acylace) a detekci nekovalentních komplexů. Přednáška by měla přesvědčit o eleganci hmotnostní spektrometrie a zbavit posluchače možných obav ze složitosti interpretace základních spekter.



Obr. 3. Kolizní spektrum protonované molekuly heptapeptidu VGQLVEV (m/z 743). Aminokyselinovou sekvencí lze „přečíst“ z kompletní série iontů typu b . V oblasti nízkých hmotností spektra lze nalézt tzv. immoniové ionty, které charakterizují jednotlivé aminokyseliny.



Obr. 4. Kolizní spektrum $[M+4H]^+$ iontu peptidu VGQXVEVDLTLEHVQHIIGGAGNDSITGNAHDNFLA-GSGDDR

Srovnání různých metod extrakce, čištění a stanovení cytokininů

KLÁRA HOYEROVÁ, MIROSLAV KAMÍNEK, ALENA BŘEZINOVÁ, PETRE DOBREV, ALENA GAUDINOVÁ
Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha,
tel.: +420/2/203 90 436, email: jirinova@ueb.cas.cz

Cytokininů spolu s auxiny hrají klíčovou roli v regulaci vývoje rostlin. Stimulují buněčné dělení a jejich poměr k auxinům určuje směr regenerace orgánů; tj. tvorbu kořenů, prýtlů nebo nediferencovaných kalusových pletiv. Dále potlačují apikální dominanci, udržují vysokou metabolickou aktivitu pletiv, stimulují tvorbu chlorofylu a zpomalují senescenci rostlin (Kománek, 1997); po jejich aplikaci též dochází ke zvýšení tvorby biomasy (Kamínek *et al.* 1997). Cytokininů stimulují diferenciaci plastidů a tvorbu škrobu (Luštinec *et al.* 1984), zvyšují toleranci vůči extrémním podmínkám prostředí, např. zasolení nebo extrémním teplotám.

Řízení těchto základních biologických procesů je založeno na změnách hladin cytokininů v rostlinných buňkách.

Stanovení obsahu cytokininů v rostlinném materiálu má zásadní význam pro studium metabolismu a fyziologických funkcí cytokininů. V tomto příspěvku je porovnán vliv různých metod extrakce a čištění na imunochemické stanovení cytokininů pomocí RIA a ELISA a srovnání jejich časové náročnosti.

Princip metod

Stanovení obsahu jednotlivých cytokininů probíhá v několika krocích:

- 1) odběr vzorku
- 2) extrakce cytokininů
- 3) čištění extraktů
- 4) frakcionace cytokininů
- 5) imunochemické stanovení jednotlivých cytokininů

Odběr vzorků: Osvědčilo se uchování vzorků při -70°C při čemž není nutné vzorky zmrazovat v kapalném dusíku.

Extrakce cytokininů: Byla porovnána metoda extrakce Bieleskiho činidlem a extrakce acetonem.

Čištění extraktu: Bylo porovnáno vytřepávání extraktu do *n*-butanolu při různém pH a purifikace extraktu na kolonách iontoměníčů.

Princip čištění extraktů vytřepáváním spočívá ve změnách polaritů cytokininů při různém pH. Cytokininové base přecházejí v kyselém prostředí do vodní fáze a naopak v zásaditém prostředí do organické fáze (Březinová *et al.* 1992). V dalším kroku byl vzorek přečištěn na kolonce SEPARON Si-C18.

Při použití kolon iontoměníčů byly cytokininů navázány na SP-Sephadex a eluovány

hydroxidem amonným; předtím byly na DEAE-Sephadexu zachyceny nečistoty nesoucí záporný náboj. V posledním kroku jsou cytokininy zachyceny na hydrofobní kolonce C18 (reversní fáze) a z ní eluovány methanolem.

K rozdělení cytokininů na frakce obsahující jednotlivé cytokininy bylo použito vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Porovnání stanovení cytokininů různými imunochemickými metodami: Imunochemické metody jsou založeny na specifické reakci antigen-protilátka. Protilátky specifické proti fytohormonům lze získat po imunizaci teplokrevných živočichů konjugátem bílkoviny s hormonem. Ke stanovení lze použít metodu RIA nebo ELISA.

RIA: Metoda je založena na vzájemném vytěšňování hormonu a jeho radioaktivně značeného analogu z vazby na protilátku. Po ustavení rovnováhy se stanoví radioaktivita zbylá v roztoku nebo vázaná na protilátku.

ELISA: Protilátky jsou navázány na povrch jamek speciálních destiček a na ně je následně navázán volný hormon. V následujícím kroku jsou volná vazebná místa protilátky vysycena cytokininem konjugovaným s detekčním enzymem (peroxidasa, fosfatasa). Po dodání roztoku substrátu je stanovena rychlost jeho rozštěpení konjugovaným enzymem na barevný produkt, jehož koncentraci lze stanovit kolorimetricky. Rychlost tvorby produktu je nepřímo úměrná koncentraci cytokininů ve vzorku.

Koncentrace hormonu se odečítá z kalibračních křivek.

Závěr

V příspěvku bude srovnána rychlost, citlivost a přesnost výše uvedených postupů.

Literatura

- Březinová, A., Holík, J., Chvojka, L.: Radioimmunoassay of isopentenyladenosine in plants.
- In: Kamínek, M., Mok, D.V.S., Zažímalová, E.: Physiology and biochemistry of cytokinins in plants, 1992, s.479-481, SPB Academic Publishing, Hague.
- Kamínek, M.: Progress in cytokinin research. Trends in Biotechnology, 1992, č.10, s.159-164.
- Kománek, D.: Senescence listových segmentů ovsu (*Avena sativa* L. cv. Auron) a její regulace aplikací kinetinu. Diplomová práce, Katedra fyziologie rostlin, PŘF UK Praha, 1997.
- Luštinec, J., Kamínek, M., Beneš, K., Conrad, K.: Hormone like effects of vascular tissue on starch accommodation.
Physiol. Plant., 1984, č.61, s.224-230.

Stanovení kyseliny abscisové metodou ELISA

ZUZANA KADLECOVÁ A ILJA PRÁŠIL

Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6,
tel.:02/330 22 443, email: kadlecova@hb.vurv.cz

Úvod

Rostlinný hormon kyselinu abscisovou (ABA) lze stanovit řadou metod, z nichž se v poslední době rozšířily především imunoanalytické metody jako je RIA (*Radio Immuno*

Assay) či ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pro svoji účinnost, rychlost a nenáročnost z hlediska zpracování rostlinného materiálu. Dále popisujeme postup stanovení ABA pomocí nepřímého typu ELISA.

Vybavení a materiál

ELISA- reader, vodní lázeň, chlazená centrifuga, třepačka, chlazený box, lednice, vortex, automatické pipety z toho jedna vícekanálová, plastový box pro inkubaci desky, mikrotitrační desky.

Chemikálie:

Pufr1: 6,05 g Trizma, 0,2 MgCl₂ a 8,8 g NaCl rozpustit v 1 l destilované vody a pomocí 37% HCl upravit pH na 7,8.

Pufr2: 0,05 M NaHCO₃ pH 9,6

Promývací pufr: Do 1 l pufru 1 přidat 1 g BSA a 0,5 ml Tween 20.

Další chemikálie:

(±)-cis,trans-ABA , primární protilátka MAC252 rozpuštěná ve fosfátovém pufru dle Dr. S.A. Quarrie (John Innes Centre, Norwich, UK), sekundární protilátka (Anti-Rat IgG), 5N KOH, p-nitrofenylfosfát v tabletách, ABA-4'-BSA konjugát (Hansen 1996, Weiler 1980) rozpuštěný v pufru 2.

Postup

Rozetřeme 0,5 g čerstvé hmoty rostlinného materiálu v kapalném dusíku a přelijeme do zkumavek nebo použijeme 30- 40 mg lyofilizovaného materiálu rozdrčeného na prášek. Poté přidáme 5 ml destilované vody a dáme třepat přes noc na 4 °C. Připravíme si mikrotitrační desku na následující den přidáním 200 µl ABA- 4'-BSA konjugátu do každé jamky. Namícháme vzorky ABA pro kalibrační křivku v koncentracích 8000(B⁻), 4000, 2000, 1000, 500, 250 a 125 pg / 100 µl. Desku ponecháme přes noc v lednici (4 °C). Následující den zcentrifugujeme vzorky za pomoci chlazené centrifugy 10 minut při 5000 g. Supernatant odpipetujeme do předem připravených zkumavek. Z desky vylijeme ABA- 4'-BSA konjugát a promyjeme ji 3 x promývacím pufrům. Poslední promývací dávku necháme v desce a inkubujeme 20 min ve vodní lázni při 37 °C. Poté pufr vylijeme a desku oklepeme dosucha. Do jamek napipetujeme 100 µl standardu nebo vzorku vždy ve třech opakováních a do každé jamky přidáme 100 µl primární protilátky MAC252. Desku inkubujeme 3 hodiny (nebo přes noc) v lednici (4 °C). Mezitím si připravíme 20 µl sekundární protilátky, kterou smícháme s 20 ml pufru 1. Poté vylijeme obsah desky a 3 x promyjeme promývacím pufrům a oklepeme dosucha. Do každé jamky napipetujeme 200 µl připravené sekundární protilátky a desku inkubujeme 1 hod při 37 °C ve vodní lázni. Připravíme 0,05 mM nitrofenylfosfát rozpuštěním 1 tablety ve 20 ml pufru 2. Desku promyjeme 5 x promývacím pufrům a oklepeme dosucha. Do každé jamky napipetujeme 200 µl připraveného nitrofenylfosfátu a desku umístíme na cca 20 min na 37 °C do vodní lázně do doby než je absorbance vzorku bez ABA okolo 1,0. Pomocí ELISA-readeru měříme absorbanci při 405 nm. Reakci zastavíme přidáním 50 µl KOH do každé jamky.

Na jedné desce lze stanovit ABA pro 24 vzorků ve třech opakováních. Vzorky není třeba pro analýzu čistit. Pro všechny případy inkubace mikrotitrační desky se používá plastový box s navlhčenou buničinou na dně. Analýzu není vhodné provádět při vyšších teplotách v laboratoři (např. v laboratořích umístěných na jižní straně budov v letním období). Výsledky měření obsahu ABA v rostlinném materiálu, v našem případě v listech ječmene, jsou srovnatelné s výsledky měření obsahu ABA metodou RIA. Výhodou metody ELISA je oproti metodě RIA, skutečnost, že její realizace nevyžaduje existenci radioisotopové laboratoře.

Literatura

Hansen, H. 1996.- Dissertation work. Universität Hamburg.
Weiler E.W. 1980.- *Planta* **148**: 262- 272.

Další doporučená literatura

Walker- Simmons, M.K., Abrams, S.R. 1991. – In: Davies, W.J., Jones, H.G. (eds.): *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. S. 59. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.

Poděkování: Zavedení této metody na naše pracoviště bylo financováno MŠMT ČR z Projektu dvoustranné česko-německé vědeckotechnické spolupráce TSR-110-97 a ME 311 s využitím poznatků získaných v laboratoři prof. Dörfflinga z University Hamburg.

Vazebné bílkoviny pro cytokininy v semenech obilnin: specifické fyziologické funkce a metodické přístupy

MIROSLAV KAMÍNEK, ALENA GAUDINOVÁ, PETR DOBREV

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 135, 162 05 Praha 6,
tel.: 02/203 90 445, email: kaminek@ueb.cas.cz

Úvod

Vazebné bílkovin pro fytohormony jsou proteiny, jejichž funkcí je rozpoznání fytohormonálního signálu a jeho přenos na další složky na ně navazujících signálních drah, vedoucích k indukci specifické fyziologické odpovědi. Receptor musí vykazovat vlastnosti, které umožňují jeho funkční interakci s fytohormonem, tj. vysokou afinitu a specifitu vůči fytohormonu, jakož i nízkou kapacitu potřebnou k nasycení vazby za podmínek dynamické rovnováhy. Na rozdíl od živočichů byla v rostlinných buňkách identifikována řada vazebných bílkovin, které splňují většinu požadavků kladených na klasické receptory, chybí však většinou důkazy o jejich fyziologické významnosti, tj. funkční závislosti fyziologické odpovědi na vazbě fytohormonu na vazebnou bílkovinu. Vztah „příliš mnoho vazebných proteinů, ale málo receptorů“ (Firn 1987) naznačuje, že některé z těchto bílkovin mohou zastávat jiné funkce, než je zapojení do přenosu hormonálního signálu.

K vazebným bílkovinám jejichž fyziologická funkce není dosud objasněna patří proteiny vázající cytokininy (*cytokinin binding protein*, CBP) v semenech obilnin a některých dalších rostlin. Vůči klasickým receptorům se vyznačují některými odliš-

nostmi: (1) jsou přítomny v obilkách ve vysokých koncentracích, kde představují až 10% rozpustných bílkovin embrya, (2) mají velmi nízkou afinitu k isoprenoidním a vysokou afinitu k aromatickým cytokininům a (3) jsou lokalizovány v embryu a na rozhraní endospermu a embrya (viz Brinegar 1994). Vysoký obsah CBP v semenech obilnin umožňuje jejich využití pro *in vitro* studium mechanismů vazby cytokininu na „receptor“ a vývoj metod vazebných testů. Jejich vysoký obsah v některých pletivech může výrazně ovlivnit koncentraci volných cytokininů a proto vyžaduje modifikaci stávajících metod extrakce a stanovení aromatických cytokininů tak, aby nedocházelo ke ztrátám v důsledku jejich vazby na vazebnou bílkovinu. Tento příspěvek je zaměřen na zvýšení účinnosti a přesnosti extrakce cytokininů z obilek pšenice a ovsa s vysokým obsahem CBP.

Materiál a metody

V práci bylo použito zralých obilek pšenice a ovsa. CBP byl izolován vysrážením z postribosomálního supernatantu (20.000 g, 20 min.) po okyselení na pH 5,0 a dále čištěn podle Brinegara *et al.* (1985) chromatograficky na sloupcích fosfocelulose a N⁶-benzyladeninu (BA) navázaného na Sepharosu 4B. CBP byl detegován v chromatografických frakcích pomocí vazebných testů založených na ekvilibrační dialýze a ultrafiltraci s pomocí [³H] BA o vysoké molární radioaktivitě (0,6 TBq mmol⁻¹) (Kamínek a Fox 1992). Nativní CBP izolované z pšenice a ovsa byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na podjednotky o molekulární hmotnosti 53 kDa, resp. 47 kDa. Ke stanovení stability vazby [³H] BA na CBP v průběhu vysrážení proteinu bylo použito precipitace pomocí síranu amonného a methanolu.

Cytokinininy byly stanoveny po jejich vytěsnění z vazby na CBP pomocí BA (10⁻⁴M), CBP byl vysrážen po okyselení roztoku na pH 5,0 a cytokinininy byly dále čištěny na kolonkách DEAE Sephadexu, a SiC₁₈, frakcionovány pomocí HPLC a stanoveny v HPLC frakcích pomocí ELISA s použitím specifických protilátek (OLCHIM, Olomouc).

Výsledky

- 1) Při precipitaci CBP síranem amonným či methanolem zůstávají aromatické cytokinininy ([³H] BA) navázané na CBP. Volné aromatické cytokinininy se váží dokonce i na již vysrážený CBP. Při běžně používaných metodách extrakce cytokininů je CBP s navázaným cytokininem vysrážen alkoholem a odstraněn po centrifugaci z extraktu. Přítomnost většího množství CBP v analyzovaném materiálu tak vede ke značným ztrátám a snížení výtěžku cytokininů.
- 2) Stanovení výtěžnosti cytokininů v přítomnosti CBP s pomocí interních radioaktivních standardů je zatíženo značnou chybou, pokud není použito standardu identického se stanovovaným cytokininem. Tato chyba je zvláště vysoká, je-li použit isoprenoidní cytokinin jako interní standard pro stanovení aromatických cytokininů a naopak.
- 3) Rušivé působení CBP na přesnost stanovení endogenních aromatických cytokininů lze eliminovat vytěsněním navázaných cytokininů z vazby na CBP přebytkem aromatického cytokininu, který je buď syntetickým derivátem (např.

kinetin), nebo který není předmětem analýzy (např. BA) a v následném oddělení CBP od volných cytokininů např. ultrafiltrací či vysrážením po okysele- ní roztoku na pH 5.

Poznámky

Obilky pšenice obsahují až v embryu až 50 µg CBP. Toto množství CBP při molekula- rní hmotnost 140 kDa a ekvimolární vazbě může vázat při plném vysycení (viz Kamínek a Fox 1992, Brinegar 1994) až 0,36 nmolu cytokininu na embryo. To odpovídá při hmotnosti obilky 40 mg potenciální koncentraci vázaného cytokininu v obilkách 25 mM (tj. cca 10 µg cytokininribosidu/g čerstvé hmoty). Vzhledem k tomu, že CBP je soustředěn v oblasti embrya, může být koncentrace vázaného cytokininu v embryu mnohonásobně vyšší. Zlomek těchto hodnot může dramaticky zkruslit vý- sledky analýz endogenních cytokininů. Přirozený výskyt aromatických cytokininů v obilkách a akumulace jak CBP, tak aromatických cytokininů v průběhu zrání obilek, jakož i jejich pokles při klíčení (Kamínek *et al.* 2000), naznačují specifickou funkci CBP. Ta dle všeho spočívá v imobilizaci a akumulaci aromatických cytokininů v oblasti embrya v průběhu zrání obilek (prevence předčasného klíčení) a jejich uvolňování při klíčení (stimulace buněčného dělení).

Poděkování. Práce byla podpořena Grantovou agenturou ČR (grant 206/96/K188).

Literatura

- Brinegar, C. 1994. In: Mok D.W.S, a Mok, M.C. (eds) Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function., 217. CRC Press, Boca Raton.
- Brinegar, A.C., Fox, J.E. 1987. In: Klämbt, D. (ed.) Plant Hormone Receptors, 177. Springer-Verlag, Berlin.
- Brinegar, A. C., Stevens, A., Fox, J.E. 1985. Plant Physiol. 79:706.
- Firn, R.D. 1987. In: Klämbt, D. (ed.) Plant Hormone Receptors, 1. Springer-Verlag, Berlin.
- Kamínek, M., Dobrev, P., Gaudinová, A., Motyka, V., Malbeck, J., Trávníčková, A., Trčková, M. 2000. Plant Physiol. Biochem. (v tisku).
- Kamínek, M., Fox, J.E. 1992. In: Kamínek, M., Mok, D.W.S., Zažímalová, E. (eds) Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants, 461. SPB Academic Publishing,

ELISA stanovení 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny (2,4-D), TLC separace 2,4-D a jejich metabolitů

MAREK KLEMŠ, LENKA ANDRÝSKOVÁ, JANA BORKOVÁ, ZDEŇKA PROKEŠOVÁ, STANISLAV PROCHÁZKA
Ústav botaniky a fyziologie rostlin MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
tel.: 05/451 33 296, email: klems@mendelu.cz

Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová je používána v *in vitro* kulturách k indukci tvorby kalusu, buněčných suspenzí, k indukci somatické embryogenese apod. Aktuální množství 2,4-D a intenzitu jejího metabolismu v pletivech lze stanovit pomocí TLC (*thinlayer chromatography*) a ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) metod (Audus 1959, Weiler 1984).

Extrakce a purifikace 2,4-D

Navážka cca 1 g čerstvého materiálu je po zmražení v tekutém dusíku lyofilizována a extrahována v 80% methanolu s antioxidantem butylhydroxytoluenem (100 mg.l^{-1}). Extrakce probíhá přes noc při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ a druhý den jsou extrakty třepány 1 hodinu při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po té je provedena centrifugace po dobu 20 minut při 6 000 g. Sediment je možno opakovaně rehomogenizovat a centrifugovat v 80% metanolu pro zvýšení výtěžku extrakce. Spojené supernatanty jsou purifikovány (odstranění barviv) na kolonkách C18 (Sep-pak) za využití vakuového separátoru. Eluát je odpařen na rotační vakuové odparce a po té je rozpuštěn v 1 ml destilované vody v ultrazvukové lázni. Po převedení do mikrozkušavek je vzorek zmražen v tekutém dusíku a po rozmražení je centrifugován při 3 000 g pro sedimentaci zbytků chlorofylu, proteinů atd. Vodný supernatant lze uskladnit při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Přímé stanovení 2,4-D ELISA testem

Vzorky pro stanovení 2,4-D jsou ředěny v poměru 1:100. Den předem jsou jamky mikrotitrační destičky potaženy monoklonální protilátkou E_2/G_2 v potahovacím 0,05M uhličitanovém pufru pH 9,6 (Fránek et al. 1994). Druhý den je destička třikrát promyta fosfátovým pufrům s Tweenem pH 7,2. Následuje pipetování standardů 2,4-D a ředěných vzorků (100 ml), traceru (konjugát 2,4-D-peroxidasa, 50ml). Po 1 hodině inkubace při teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$ je destička třikrát promyta fosfátovým pufrům s Tweenem. Po té je do jamek pipetován substrát (100 ml roztoku 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu s H_2O_2 v octanovém pufru pH 5,8). Po 15 minutách inkubace je enzymatická reakce zastavena 100 ml 1M kyseliny sírové. Absorbance barevného produktu je měřena na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm.

Separace 2,4-D a jejích metabolitů pomocí TLC

Pro oddělení volné ^{14}C -2,4-D od jejích metabolitů pomocí TLC je odparek rozpuštěn v methanolu a 150 ml tohoto odparku je nanášeno na start silufolových desek s UV indikátorem. Dělení probíhá nejprve ve vyvíjecí směsi benzen : kyselina octová 75 : 12. Tato vyvíjecí směs odděluje volnou 2,4-D ($R_f = 0,7$) od polárních metabolitů 2,4-D ($R_f = 0,0-0,1$), a nepolárních metabolitů ($R_f = 1,0$). Dále jsou ze startu elucí ethylacetátem získány polární metabolity a chromatografií ve vyvíjecí směsi ethylacetát : 2-butanon : kyselina mravenčí : voda = 50 : 30 : 10 : 10 jsou odděleny konjugované formy 2,4-D s aminokyselinami resp. s glukózou. Radioaktivně značené metabolity se eluují z jednotlivých R_f zón chromatografických desek, a to vytřepáním ve 100 ml methanolu po dobu 30 minut. Po přidání kapalného scintilátoru SLD-41 se měří radioaktivita v dpm (desintegrace za minutu).

Poznámky

- 1, Metabolismus lze sledovat za použití značení odlišnými isotopy, např. 2,4-D je značena ^{14}C a aminokyselina či glukosa ^3H . Případný detegovaný konjugát je pak dvojnásobně značená ^{14}C - ^3H -sloučenina. Navíc tento postup umožňuje použití jednodušší techniky TLC ve srovnání s např. méně dostupnými HPLC, HPTLC aj.

- 2, K orientační visualizaci polohy 2,4-D (např. neznačené) po TLC separaci lze využít negativního barvení na berlínskou modř ($\text{FeCl}_3 : \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v poměru 1:1) či pozitivního barvení difenylaminem do červena (Baranovska a Pieszko 1998).
- 3, Stanovení aktuálního obsahu 2,4-D pomocí ELISA s využitím monoklonální protilátky E_2/G_2 je vysoce specifické, neboť tato protilátka nevykazuje křížové reakce s výše popsány metabolity 2,4-D.
- 4, Metabolity (neznačené) eluované z TLC lze podrobit alkalické hydrolyze, případně štěpit β -glukosidasou za uvolnění 2,4-D, kterou je po přečištění možno opět stanovit ELISA testem.

Literatura

- Audus, L. J. 1959.- Plant growth substances. Leonard Hill, London.
Baranowska, I., Pieszko, C. 1998. - J. Planar Chromatogr. **11**, 119-122.
Fránek, M., Kolář, V., Granátová, M., Nevoránková, Z. 1994. - J. Agric. Food Chem. 1369-1374.
Weiler, EW. 1984. - Annu Rev. Plant Physiol. 54: 510-514.

Methodical contribution to the quantitative analysis of some organic substances in woody plants

LUCIA LUNÁČKOVÁ¹, ELENA MASAROVIČOVÁ¹, KRISTÍNA WEISSOVÁ²

¹Department of Plant Physiology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, Sk-842 15 Bratislava, Slovak Republic, tel.: +421/7/602 96 646, email: lunackova@fns.uniba.sk

²Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-2, Sk-84215 Bratislava, Slovak Republic

Abstract

Methods used in our experimental work concerned quantitative analyses of some organic substances such as starch, reducing sugars and proteins in the leaves and roots of woody plants, species of genus *Karwinskia*. These plants are subtropical shrubs or trees from Mexico producing substances with antineoplastic effects. As the phenolic compounds usually occur in the woody plants standard analytical methods had to be modified. The basis of methodological approach of quantitative analyses of all above mentioned substances was spectrophotometric determination (Jenway 6405 UV/Visible, Great Britain).

Starch concentration was established in fresh material extracted with 80 % ethylalcohol and centrifuged at 2000 g for 10 min. The precipitate was solubilised in 3.25 cm³ 52 % HClO_4 , left to stand on ice for 15 min and centrifuged at 3000 g for 15 min. Concentration of starch in supernatant was determined spectrophotometrically with anthron solution (0.1 g anthron in 50 cm³ 95 % H_2SO_4) at 630 nm (Davidek 1981).

Reducing sugar concentration was also determined in fresh material extracted with 80°C water for 30 min (Pribela 1978). However, instead of filtration the centrifugation in consequence of 50 times lower sample content had to be used. The neutral $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ was added and centrifuged at 3000 g for 20 min. For elimination of Pb, the solution of $\text{Na}_2(\text{COO})_2$ was added and centrifuged at 3000 g for 15 min. Determination of reducing sugars concentration in supernatant by Schoorl (1969) was not successful, so that the method according to Dubois et al. (1956) had to be used. Above menti-

oned substances were determined spectrophotometrically with 80 % phenol and 5 cm³ 96 % H₂SO₄ at 480 nm.

Concentration of proteins was determined in fresh material extracted with 80 % acetone. As the phenolic substances had perturbing influence on determination the buffer was needed: 0,1 M Tris HCl pH = 7,8; 0,01 M MgCl₂; 0,002 M EDTA; 0,02 M 2-ME; 0,002 M DTE; 1% Tween 80; 1% insoluble PVP; 0,02 M NaHCO₃. This suspension was stirring on magnetic stirrer for 40 min. and centrifuged at 3000 g for 10 min. 1 cm³ 10% CCl₃ COOH was added to 1 cm³ sample and left to stand on ice for 3 h. After centrifugation at 8000 g for 10 min., the precipitate was solubilised in 1 cm³ cold acetone and centrifuged again. At last, the proteins were solubilised in 1 cm³ 0.1 M NaOH (Sýkorová 1988, Konečná et al. 1989). Concentration of proteins was determined spectrophotometrically with Coomassie Brilliant Blue R-250 at 595 nm (Bradford 1976).

Analysis of variance was conducted for all the data. We would like to notice that above mentioned analytical methods require commercial chemicals and standard laboratory equipment.

References

- Bradford, M. M. 1976.- Anal. Biochem. **72**: 248-254.
 Davidek, J. 1981. - Laboratory Manual of Food Analysis. SNTL, Prague. [in Czech]
 Dubois, M. Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956.- Anal. Chem. **28**: 350.
 Konečná, B. Frič, F. Masarovičová, E. 1989.- Photosynthetica **23**: 566-574.
 Příbela, A. 1978. - Analysis of natural substances in food. ALFA, Bratislava. [in Slovak]
 Schoolr, A. 1969.- Příbela A. (ed.): Analysis of food I. SVST, Bratislava. [in Slovak]
 Sýkorová, B. 1988.- Negative effects of abiotic factors on biochemical characteristics of photosynthesis in the leaves of three oak species. M.S.Thesis. Institute of experimental biology and ecology CBEV SAS, Bratislava.

Přehled metod stanovení enzymové aktivity cytokininoxidasy a zeatinreduktasy v rostlinných pletivech

VÁCLAV MOTYKA

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

Hladiny fytohormonů včetně cytokininů jsou v rostlinných buňkách regulovány na úrovni jejich biosyntézy, degradace nebo metabolických přeměn souvisejících s modifikací nebo ztrátou biologické aktivity. Vzhledem k tomu, že dosud není známa přímá cesta biosyntézy cytokininů v netransformovaných rostlinách, zaměřuje se experimentální studium cytokininů především na problematiku jejich degradace a modifikace jejich biologických aktivit. Na regulaci těchto metabolických drah se významnou měrou podílejí enzymy cytokininoxidasa a zeatinreduktasa.

Cytokininoxidasa

Cytokininoxidasa je klíčovým enzymem odbourávání cytokininů v rostlinných ple-

tivech. Katalyzuje oxidativní štěpení nenasyceného N^6 -postranního řetězce isoprenoidních cytokininů za vzniku adeninu nebo jeho derivátů a aldehydu odpovídajícího postrannímu řetězci (3-methyl-2-butenal). Na měření rychlosti této reakce jsou založeny používané metody stanovení enzymové aktivity.

Stanovení aktivity radioisotopovou metodou

Vychází z využití radioaktivně značeného substrátu N^6 -(ϵ^2 -isopentenyl)adeninu (iP) nebo *trans*-zeatinu (*t-Z*), případně jejich ribosidů, v testech *in vitro*. Aktivita cytokininoxidasy je stanovena po inkubaci enzymového preparátu se značeným substrátem na základě měření radioaktivity vzniklého produktu (adeninu nebo adenosinu), který je oddělen od nezreagovaného substrátu vhodnou chromatografickou metodou. Vyjadřuje se nejčastěji v přepočtu na 1 mg bílkovin, detegovaných v hrubém extraktu (tj. v nmol Ade/mg bílk. x hod).

Složení inkubační směsi a podmínky inkubace jsou vzhledem k rozdílům v biochemických vlastnostech cytokininoxidás izolovaných z různých rostlinných zdrojů (viz. přehledy Armstrong 1994, Hare a Van Staden 1994, Galuszka et al. 1999) poměrně variabilní. Obecně platí, že v testech enzymové aktivity je aplikován značený substrát (^3H nebo ^{14}C -značení na purinovém jádře) v koncentraci 2-10 μM . Inkubace probíhá při teplotě 37°C po dobu 30 minut - 4 h v různých pufrch v rozmezí pH 6.0-9.0 podle konkrétního rostlinného materiálu. K oddělení substrátu od produktu enzymatické reakce se využívá TLC (mikrokrystalická celulóza, Si-C₁₈) nebo HPLC, radioaktivita vzniklého produktu je měřena kapalinovým scintilačním počítačem nebo ve frakcích po HPLC monitorována průtokovým radiodetektoem.

Specifikace a optimalizace podmínek stanovení aktivity cytokininoxidasy ve vyvíjejících se obilkách pšenice a v kalusové kultuře tabáku, prováděných v naší laboratoři, je předmětem jiného příspěvku v tomto sborníku.

Stanovení aktivity kolorimetrickými metodami

V současné době jsou pro stanovení aktivity cytokininoxidasy používány dvě kolorimetrické metody. První z nich je založena na reakci 3-methyl-2-butenalu (reakční produkt enzymatické degradace iP) s *p*-aminofenolem, při níž v kyselém prostředí vzniká Schiffova báze s absorbním maximem 352 nm (Libreros-Minotta a Tipton 1995). Aktivita cytokininoxidasy je stanovena na základě měření A_{352} po odečtu z kalibrační křivky pro 3-methyl-2-butenal a většinou vyjádřena v nmolech odbouraného iP v přepočtu na 1 mg bílkovin za hodinu.

Podstatou další kolorimetrické metody je pokles intenzity modrého zbarvení roztoku 2,6-dichloroindofenolu, který je přidáván do reakční směsi jako akceptor elektronů, při vlnové délce 600 nm (K.Bilyeu, Univ. Missouri, osobní sdělení). Test je použitelný pro stanovení aktivity cytokininoxidasy v slabě alkalickém nebo neutrálním prostředí (Galuszka et al. 1999), jeho bližší specifikace však dosud nebyla publikována.

Vedle uvedených kolorimetrických metod byl již v počátcích studia cytokininoxidasy popsán spektrofotometrický test, založený na změně ÚV absorbce spojené s degra-

dací cytokininů (Whitty a Hall 1974), biochemický základ zjištěné změny absorpčního spektra ovšem nebyl objasněn.

Zeatinreduktasa

Zeatinreduktáza je enzym, který katalyzuje redukci nenasyceného N^6 -postranního řetězce *trans*-zeatinu za vzniku dihydrozeatinu (DHZ). Vzhledem k tomu, že DHZ není substrátem cytokininoxidasy, je zřejmé, že se zeatinreduktasa podílí svým katalytickým působením na regulaci hladin aktivních cytokininů zejména jejich „ochranou“ před degradací.

Stanovení aktivity zeatinreduktázy bylo dosud popsáno pouze pro enzym izolovaný z nezralých embryí fazolu (Martin et al. 1989). Aktivita je v tomto případě detekována radioizotopovou metodou na základě konverse [^{14}C]*t-Z* (*cis*-zeatin, zeatinribosid ani iP nejsou substrátem zeatinreduktasy) na DHZ po inkubaci (1 h, 27°C) ve fosfátovém pufru (pH 8.0). Pro stanovení aktivity je nutná přítomnost kofaktoru NADPH v reakční směsi. Separaci produktů enzymatické reakce lze provést vhodnou chromatografickou metodou - v daném případě (Martin et al. 1989) byla použita HPLC a následná analýza frakcí provedena na základě měření jejich radioaktivity scintilačním počítačem.

Závěr

Jak radioisotopová, tak kolorimetrické metody stanovení aktivit uvedených rostlinných enzymů mají své výhody i nevýhody. Hlavní výhodou radioisotopové metody je vysoká citlivost a specifita, dále nízká časová náročnost a jednoduchost. Nevýhody lze spatřovat v poměrně značných finančních nárocích (vysoké ceny značených substrátů, kapalného scintilátoru, drahý provoz scintilačního počítače), požadavcích na speciální zařízení a povolení pro práci s radioaktivním materiálem, jakož i v aspektech ekologických. Opak platí pro metody kolorimetrické, které jsou finančně i přístrojově vcelku nenáročné, avšak poměrně náročné na čas a manipulaci (současně s každým měřením vzorků vyžadují kalibraci). Kromě toho kolorimetrická stanovení obecně nejsou příliš specifická a v některých případech jsou proto nevhodná pro detekci enzymové aktivity v hrubých extraktech.

Z toho je zřejmé, že volba vhodného postupu pro stanovení aktivity uvedených rostlinných enzymů není jednoduchá a závisí na konkrétních podmínkách a cílech detekce.

Literatura

- Armstrong, D.J. 1994. - In: Mok D.W.S., Mok M.C. (eds.): Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function, pp. 139-154. CRC Press, Boca Raton.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Strnad, M., Peč, P. 1999. - In: Strnad M., Peč P., Beck E. (eds.): Advances in Regulation of Plant Growth and Development, pp. 39-48. Peres Publ., Prague.
- Hare, P.D., van Staden, J. 1994. - *Physiol Plant* **91**: 128-136.
- Libreros-Minotta, C.A., Tipton, P.A. 1995. - *Anal Biochem* **231**: 339-341.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Shaw, G., Mok, D.W.S. 1989. - *Plant Physiol* **90**: 1630-1635.
- Whitty, C.D., Hall, R.H. 1974. - *Can J Biochem* **52**: 789-799.

Poděkování: Při realizaci této práce bylo využito finanční podpory Grantové agentury ČR (grant č. 522/00/1346).

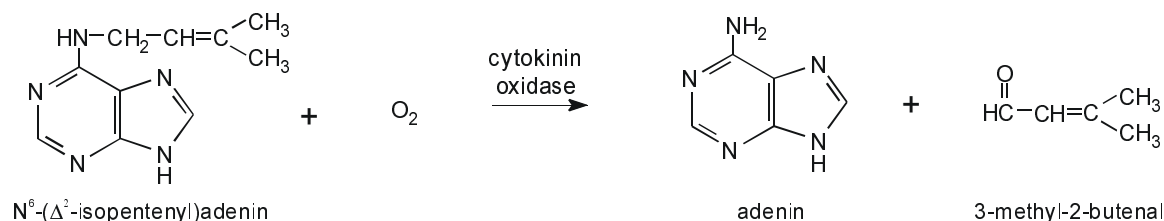
Extrakce a stanovení aktivity cytokininoxidasy v obilkách pšenice a v kalusové kultuře tabáku

VÁCLAV MOTYKA, MIROSLAV KAMÍNEK

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací, Rozvojevá 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 mikrozkušavkách (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 VEVEDOVA^{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-

sing biologically active cytokinins from their storage and transport forms. The Zm-p60.1 protein exists as homodimer located in plastids (chloroplasts) and this homodimer or higher oligomers are biologically important. The structural knowledge of the Zm-p60.1 is important for a thorough understanding of the catalytic activity and specificity for this enzyme.

Results and Discussion

Purification and Crystallization

Zm-p60.1 was overproduced and purified as a fusion protein with His tag from *E. coli* using modified procedures as in (Zouhar 1999). Protein purification has been carried out by TALON cobalt column and gel filtration on a BioCAD system.

Crystals were grown at room temperature by hanging drop diffusion method with 2-3 mg.ml⁻¹ Zm-p60.1 against reservoir solution of 20-30% (w/v) PEG 4000, 0.1 M sodiumcitrate, pH 5.3-5.9 and 0.2 ammoniumacetate (Fig.1).



Fig. 1. Monoclinic crystal of β -glucosidase from *Zea mays*

Data collection and processing

Crystal with approx. 0.4 x 0.3 x 0.1 mm³ dimensions has been immersed for a few seconds in cryoprotectant and then flash-frozen. Diffraction data have been collected to 2.05Å resolution at ~ 100 K on beamline BL711 of MAX-Lab synchrotron in Lund, Sweden, with image plate detector mar345. *In situ* annealing of the crystal has been applied to increase the order and resolution limit. The data have been processed by the DENZO & SCALEPACK packages. Data collection statistics are summarised in Table 1. The solvent content of the crystal is about 35%, and it contains a homodimer per asymmetric unit.

Structure solution

The crystal structure of Zm-p60.1 has been determined by molecular replacement method using program AmoRe with search model of cyanogenic β -glucosidase (1CBG) from white clover (Barret 1995). The best solution from molecular replacement has been subjected to several cycles of rebuilding and refinement by the program CNS.

No NCS (non crystallographic symmetry) restraints have been applied during the refinement. The current refined model has R-factors of 24.7% (R_{free}) and 19.3% (R_{cryst}) with 988 residues and 412 water molecules.

Table 1: Data collection statistics

* Values in parenthesis are the highest resolution shell

Wavelength (Å)	0.9831
Resolution (Å)	68-2.05 (2.42-2.05)*
Completeness (%)	94.7 (85.7)
R_{merge} (%)	5.3 (17.6)
$I/\sigma(I)$	15.5 (4.9)
Space group	$P2_1$
Cell parameters (Å)	a = 55.66
	b = 110.72
	c = 72.94
	β = 92.1

Conclusion

Similar to other β -glucosidases, Zm-p60.1 is a single domain $(b/a)_8$ barrel composed of more than 500 residues. The retaining mechanism of enzymatic catalysis of β -glycosidic bond is represented by the well-conserved active site with two most important residues – a proton donor (186 Glu) and a nucleophile/base (401 Glu) as shown in Fig. 2. We are currently finishing up the refinement of the structure and investigating the dimerization interface.

Acknowledgement

This work was supported by grants VS96095 (LBSD) and VS96096 (LMFR) from Grant Agency of the Ministry of Education of the Czech Republic. The practical work was mostly done in the Dept. of Molecular Biophysics of Lund University. JV is a recipient of the Socrates Erasmus Free mover grant.

References

- Zouhar, J., Nanak, E. & Brzobohaty, B. (1999). *Protein Expression and Purification*, **17**, 153-162.
 Barret, T., Suresh, C. G., Tolley, S. P., Dodson, E. J. & Hughes, M. A. (1995). *Structure*, **3**, 951-960.

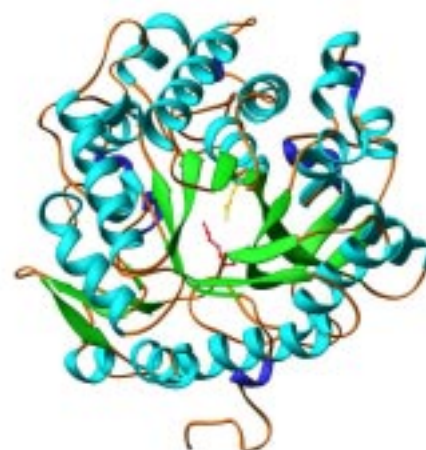


Fig. 2: The topology of the maize β -glucosidase molecule. Ribbon diagram showing the overall fold of the molecule.

Estimation of activity of auxin uptake and efflux carriers in the cells of VBI-0 tobacco strain

EVA ZAŽÍMALOVÁ AND JAN PETRÁŠEK

Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojeová 135, 16502 Prague 6, Czech Republic, tel.: 02/203 90 431, email: petrasek@ueb.cas.cz

Abbreviations: auxin efflux carrier, AEC; auxin uptake (influx) carrier, AUC; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D; indole-3-acetic acid, IAA; naphthalene-1-acetic acid, NAA; naphthalene-2-acetic acid, 2-NAA; 1-N-naphthylphthalamic acid, NPA

Abstract

Auxins, together with cytokinins, play an important role in the regulation of plant cell development, namely under *in vitro* conditions. Now there is more or less extensive knowledge about dynamics of the endogenous auxin content, as well as mechanism of perception and transduction of auxin signal. However, until recently it was very difficult if not impossible to quantify the flow of auxin molecules across plasma membrane and, consequently, to understand the mutual exchange of auxin signals between extracellular and intracellular space. Here we describe the simple method according to Delbarre et al. (*Planta* 198: 532-541, 1996) for quantification of auxin uptake (influx) and efflux carrier activities, modified for the suspension-grown auxin-dependent and cytokinin-independent tobacco cell strain VBI-0.

Introduction

The growth of plant cells cultivated *in vitro* is mostly auxin-dependent. The proper balance between exogenous and endogenous auxin seems to be very important for their standard growth cycle and the translocation of auxin across plasma membrane plays a key role here. Generally, the endogenous level (or the net accumulation) of any particular compound within any particular cell compartment results from the partial contributions of several metabolic and transport (translocation) processes, and the final control of this level is rather complex. The metabolic regulations include all biosynthetic, conjugation and degradation processes (for auxin recently reviewed e.g. by Slovin *et al.* 1999). The transport (translocation) processes affect the net accumulation of individual compounds inside the cell via an exchange between 'outer' and 'inner' environment of the cell. The movement of any particular compound across cell membrane and its resulting internal accumulation is related to the degree of either lipophilicity or hydrophilicity of its molecule. Generally, its movement can proceed in both passive (by diffusion) and active (via carriers) manners. Therefore the 'intensity' of translocation of compounds depends on the actual state (i.e. on prevailing either ionic or non-dissociated form) of their molecules (which is given by actual pH in the environment or in particular cell compartment) and on the presence/absence of relevant carrier(s).

Auxin transport and accumulation

Auxins seem to be the only group of plant hormones exhibiting - on the level of

whole plant or its parts - an active transport in polar manner besides a long-distance movement via vascular tissues (Hopkins 1995, Baker 2000). This phenomenon was first demonstrated in late twenties (Went 1928). The polarity of auxin transport was later explained in general (Rubery & Sheldrake 1974, Raven 1975) by the different permeability of opposite parts of cells for dissociated and undissociated molecule of indole-3-acetic acid (IAA⁻ and IAAH, respectively), that is, in particular, by an asymmetric localisation of so-called auxin efflux carrier (translocating the IAA⁻ anion outside the cell). This idea was summarised by Goldsmith (1977) and named „chemiosmotic polar diffusion theory“. Now it is believed - on the basis of biochemical, physiological and molecular data - that the plasma-membrane-located auxin uptake (influx) carrier, AUC, together with passive diffusion contribute to the auxin translocation into the cell, while an auxin efflux carrier, AEC, drives the transport of auxin out of the cell (Delbarre *et al.* 1996, Bennett *et al.* 1998, Palme & Gälweiler 1999, Morris 2000, see Fig. 1). Thus a certain momentary endogenous auxin level inside the cell results from the activity of all these processes.

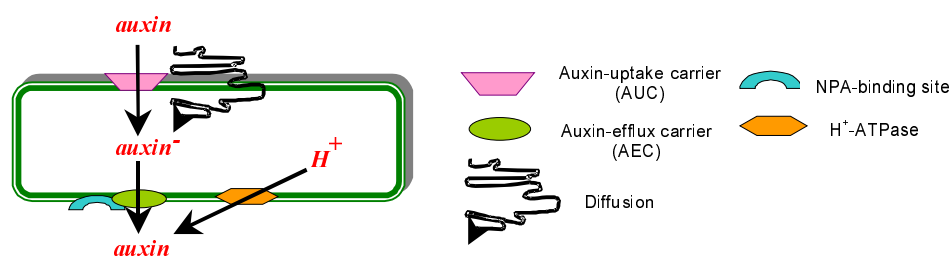


Fig. 1. Translocation of auxins into and out of the cell

Measurement of auxin accumulation

The auxin accumulation was described in detail by Delbarre *et al.* (1996). Using various radiolabelled auxins the biochemical properties (kinetic properties and specificity) of both carriers (AUC and AEC, respectively) were determined including the data on interactions of carriers with potential inhibitors (NPA, 2-NAA, etc.). Taken together, various auxins are translocated across plasma membrane in different ways according to their relative lipophilicity (NAA>IAA>2,4-D). The most lipophilic NAA molecule seems to be entering the cell mostly by passive diffusion and NAA⁻ anion is effluxed actively by AEC. On the contrary, the most hydrophilic 2,4-D is uptaken mostly via AUC and then accumulates inside the cell because it is not a substrate for AEC (see Fig. 2). On the basis of different behaviour of both AUC and AEC towards NAA and 2,4-D Delbarre *et al.* (1996) proposed a simple method for measurement of activity of these carriers: NAA can be used for determination of AEC, in contrast to 2,4-D which can serve as a marker of AUC activity. The activity of auxin-efflux carrier, and to far lesser extent also that one of the auxin-uptake carrier, can be affected by the potent polar auxin transport inhibitors, namely by 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA). New auxin transport inhibitors of aryl and aryloxyalkylcarboxylic acid type have been identified recently (Imhoff *et al.* 2000).

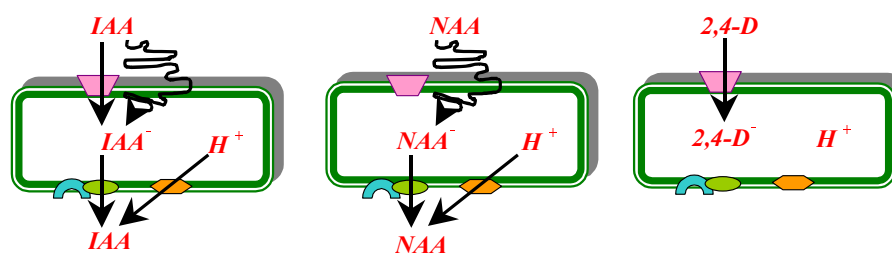


Fig. 2. Different ways of auxin translocation across plasma membrane. Based on Delbarre *et al.* (1996). See Fig. 1 for description of symbols.

The substance of the method is the determination of the accumulation of radioactive auxins from the buffer solution by the intact cells at the exact time T after labelled auxin application. The time T should not exceed ca. 10 minutes because of significant degradation of auxins during the incubation. After radiolabelled NAA application, its accumulation is a result of passive diffusion into the cells and AEC-driven flow out from the cells. The application of NPA to the cell suspension together with labelled NAA results in the increase of NAA accumulation inside the cells due to the inhibition of the AEC (Fig. 3). Thus the activity of AEC can be calculated from the difference between the labelled NAA accumulation at the time T with and without NPA treatment. In concert with Delbarre *et al.* (1996) 2,4-D is uptaken actively by AUC also in case of VBI-0 cells and there is almost no effect of NPA on 2,4-D accumulation (Fig. 4).

Since the tobacco strain VBI-0 is highly friable (no cell clumps) during the whole subculture period (Opatrný & Opatrná, 1976, Zažímalová *et al.*, 1995), the number of cells per one unit of volume (e.g. millilitre) can be calculated. Thus all measured data, as e.g. accumulation of individual auxins, can be expressed as equivalents of number of molecules (e.g. pmols) per cell number (e.g. 10^6 cells) and compared quantitatively in relation to the growth cycle of the cell strain (cf. Fig. 4). For the correct physiological interpretation of data measured the size of cells must be taken into account.

Concluding remarks

The above-described method for determination of auxin accumulation, and both AUC and AEC activity estimation is relatively quick, simple and reliable. In general, it could be used also for other hormones and/or hormone-like substances. However, it can be applied only for cell suspensions which - preferably - do not form cell clumps. The use of radiolabelled compounds seems to be necessary, even though e.g. some fluorescent derivatives might be appropriate, too. With respect to the fact, that up to date there is no alternative method for determination of the activity of auxin carriers, this simple assay provides very useful data about processes participating in the control of endogenous auxin levels in plant cells.

Acknowledgement. This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic, project No. 206/98/1510, and by the EU, INCO Copernicus project No.: ERBIC15 CT98 0118 to EZ.

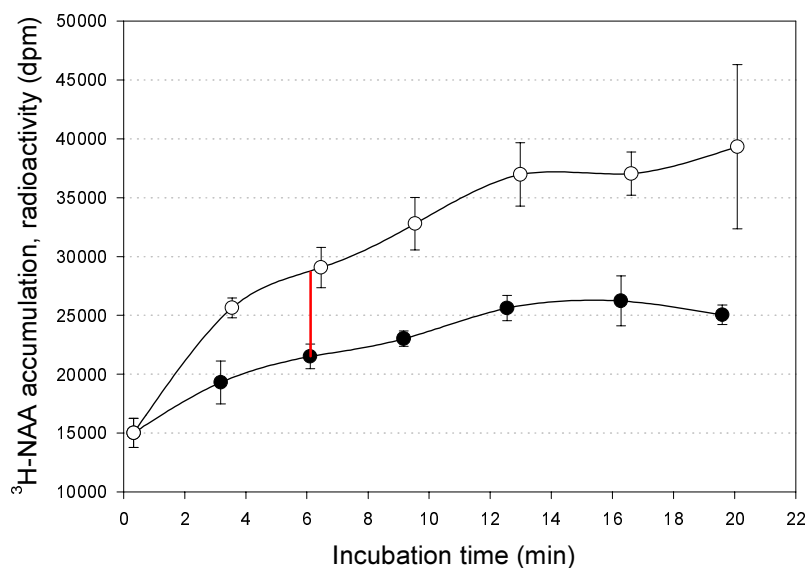


Fig. 3. Accumulation of NAA in the cells of VBI-0 tobacco strain
The method according to Delbarre *et al.* (1996) was used. Concentration of $^3\text{H-NAA}$ in assay suspension was 2×10^{-9} M. $^3\text{H-NAA}$ radioactivity was measured by liquid scintillation technique in 0.5 ml cell suspension aliquots (cell density ca. 10^5 cells per 1 ml of suspension) after removal of assay medium by vacuum filtration through filtration paper and extraction of cells by ethanol. Each measurement was at least triplicated. Activity of AEC was determined as a difference in the accumulation of $^3\text{H-NAA}$ with (empty symbols) and without (full symbols) blocking AEC by NPA (5×10^{-5} M). Red vertical bar represents the activity of AEC at time $T=6$ min.

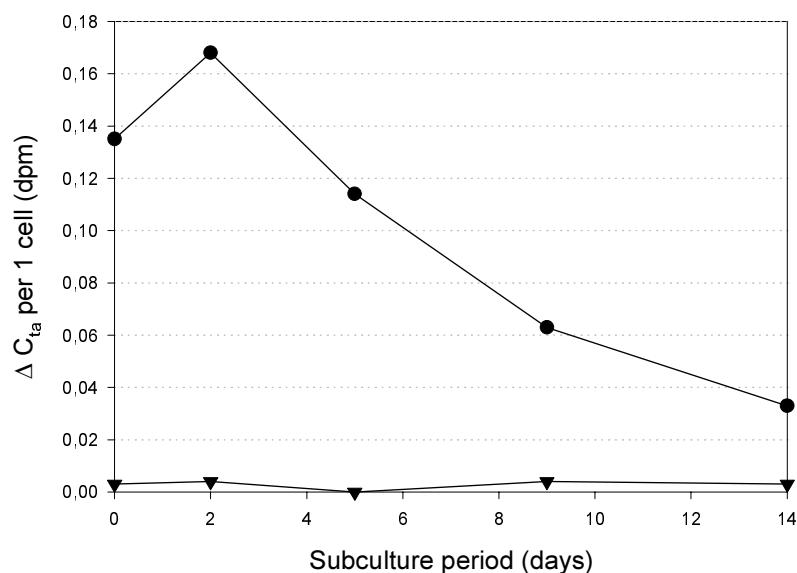


Fig. 4. The activity of auxin efflux carrier (AEC) during the subculture period of VBI-0 tobacco cell strain
See legend to Fig. 3 for details. Concentrations of $^3\text{H-NAA}$ or 2,4-D in assay suspension were 2×10^{-9} M or 2×10^{-8} M, respectively. C_{ta} was the net accumulation of NAA or 2,4-D, i.e. the difference between the radioactivity of 0,5 ml aliquot of the cell suspension at the time $T=6$ min and the radioactivity of 0,5 ml aliquot of the cell suspension just after application of $^3\text{H-NAA}$ or $^3\text{H-2,4-D}$. ΔC_{ta} was the difference between C_{ta} values for each particular auxin (circles for NAA and triangles for 2,4-D) with and without application of NPA (5×10^{-5} M).

References

- Baker, D. 2000 - Plant Growth Regul. *in press*.
- Bennett, M.J., Marchant, A., May, S.T., Swarup, R. 1998 - Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B **353**: 1511.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Guern, J. 1996 - Planta **198**: 532.
- Goldsmith, M.H.M. 1977 - Annu. Rev. Plant Physiol. **28**: 439.
- Hopkins, W.G. 1995 - In: Introduction to Plant Physiology. John Wiley & Sons, New York, p. 316.
- Imhoff, V., Muller, P., Guern, J., Delbarre, A. 2000 - Planta **210**: 580.
- Morris, D.A. 2000 - Plant Growth Regul. *in press*.
- Opatrný, Z., Opatrná, J. 1976 - Biol. Plant **18**: 381.
- Palme, K., Gälweiler, L. 1999 - Curr. Opin. Plant Biol. **2**: 375.
- Raven, J.A. 1975 - New Phytol. **74**: 163.
- Rubery, P.H., Sheldrake, A.R. 1974 - Planta **188**: 101.
- Slovin, J.P., Bandurski, R.S., Cohen, J.D. 1999 - In Libbenga, K.R., Hall, M.A., Hooykaas, P. (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, Ser. New comprehensive biochemistry, Elsevier, Amsterdam, p. 115.
- Went, F.W. 1928 - Rec. Trav. Bot. Neerl. **25**: 1.
- Zažímalová, E., Opatrný, Z., Březinová, A., Eder, J. 1995 - J. Exp. Bot. **46**: 1205.

