



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Histochemická lokalizace kyselé fosfatázy metodou simultánní azokopulace (Beneš a kol. 1961 in Lojda a kol. 1979)

Kyselá fosfatáza (AcP) = kyselá fosfomonoesteráza, ortofosfomonoester fosfohydroláza, 3.1.3.2

Enzym v kyselé oblasti katalyzuje hydrolýzu esterů ortofosforečné kyseliny s různými alkoholy a fenoly podle následujícího schématu:



Kyselá fosfatáza navíc hydrolyzuje pyrofosfátové sloučeniny a působí jako transfosforyláza. Všeobecnými inhibitory jsou fluoridové a fosfátové ionty, naopak Mn^{2+} ionty mohou enzym aktivovat, pH optimum je mezi 4 a 5.

Kyselá fosfatáza je lokalizována hlavně v lysozomech. Existují též extra-lysozomální kyselé fosfatázy, které se vyskytují hlavně v ER a hyaloplazmě. Protože lysozomy se snadno zničí a kyselá fosfatáza zčásti není pevně vázána na strukturu, musí být zvláštní pozornost věnována předpůsobení pletiva. Aktivitu enzymu lze detekovat i na parafinových řezech, ale celková aktivita enzymu může být detekována jen na kryostatových řezech čerstvého pletiva metodou semipermeabilních membrán.

K detekci aktivity kyselé fosfatázy lze použít azokopulace, Gomoriho srážecí reakce i indogenní metody.

Univerzální metodou je **simultánní azokopulace** s naftol AS-BI nebo naftol AS-TR fosfátem jako substrátem a hexazonium-p-rosanilinem jako azokopulačním činidlem.

Postup:

A. příprava materiálu:

1. **Odběr vzorků:** nakrájíme přiměřeně velké segmenty kořenů a stonků - kořen kukuřice *Zea mays*, stonek kolopejky *Kalanchoe blosfeldiana*
2. **Fixace vzorků:** 4% formaldehyd v 0,05 M TRIS – HCl pufru, pH 7, 2.
doba fixace **2 hod.**
(u citlivějšího materiálu 0,5 hod. na ledu při 0°C). Pokud segmenty plavou na povrchu fixáže, infiltrujeme fixační směs při sníženém tlaku.
3. **Oplach** v 0,05 M TRIS – HCl pufru, pH 7,2 **2 x 10 minut**
4. **Kryoprezervace:** přenos vzorků do roztoků s rostoucí koncentrací sacharosu v 0,05 M TRIS – HCl pufru, pH 7,2 (3%, 5% a 7,5% sacharosa) **3 x**

B. Příprava kryostatových řezů

5. **Zhotovení bločků:** na vychlazeném bločku kryostatu zamrazíme základ média, na který přimrazíme segment, zakápneme stejným médiem a necháme dokonale zmrazit (7,5% sacharosa, želatina nebo TissueTec®).

6. **Krájení řezů:** při vhodném sklonu nože krájíme řezy přiměřené tloušťky a přeneseme je na podložní skla potažená chromovou želatinou (nebo na semipermeabilní membránu napnutou na skleněné epruvetě).
7. **Sušení řezů** na mírně vyhřáté ploténce pro zajištění dokonalá adheze řezů. Řezy nalepené na podložní skla lze krátce skladovat v ledničce.

C. Vlastní inkubace

8. **a Inkubace řezů na podložním skle:** přiměřené množství inkubačního média navrstvíme na řezy umístěné ve vlhké komůrce a necháme inkubovat.
Doba inkubace: 30 – 60' při 37°C, 1 – 2 hod. při RT nebo několik hodin v ledničce při 4°C). Při delší inkubaci za nižší teploty se vytváří reakční produkt jemnější granulace.
9. **Oplach** v destilované vodě
10. **Postfixace:** 4% formaldehyd v 0,05 M TRIS – HCl pufru, pH 7,2, (pro redukci bublinek v řezech) 2 - 4 hodiny
11. **Oplach** ve vodovodní vodě
12. **Uzavření řezů do glycerol-želatiny** (Při dehydrataci, obzvláště při přechodu ze 100% EtOH do xylénu a uzavírání do pryskyřice dochází k eluci reakčního produktu a navíc barvivo není jasně lokalizováno. Proto se odvodnění nedoporučuje.)
13. **b Inkubace řezů na semipermeabilní membráně:** inkubační médium dvojnásobné koncentrace se smíchá se stejným dílem rozvařeného chladnouceho 1% agaru v 0,05 M TRIS – HCl pufru, pH 7, 2. Přiměřené množství inkubační směsi pipetujeme do epruvety na opačnou stranu semipermeabilní membrány. Po inkubaci se membrána oddělí od epruvety a provádí se stejné procedury jako u řezů přilepených na podložní skla.

Příprava roztoků:

0,05 M TRIS-HCl pufr

1. zásobní roztok	0,2M TRIS (m.v. 121,14)	12,114 g	do 500ml
2. zásobní roztok	0,1 N HCl (m.v.36,47)	4,16 ml	do 500 ml
pro pH 7,2:	250 ml 0,2M TRIS + 450 ml 0,1N HCl		
	doplnit do 1000 ml destilovanou vodou		

4% formaldehyd v TRIS / HCl pufru, pH 7,2 (8 ml 36% formaldehydu +64 ml pufru)

3% sacharosa v TRIS / HCl pufru, pH 7,2 (3 g sacharosy do 97ml TRIS/HCl pufru)

5% sacharosa v TRIS / HCl pufru, pH 7,2 (5 g sacharosy do 95ml TRIS/HCl pufru)

7,5% sacharosa v TRIS / HCl pufru, pH 7,2 (7,5 g sacharosy do 92,5 ml TRIS/HCl pufru)

Hexazonium-p-rosanilin

Ostrost, s jakou jsou zobrazeny lysozomy na řezech, závisí především na koncentraci hexazotizovaného p-rosanilinu. Čím vyšší koncentrace, tím ostřejší je zobrazení lysozomů. Avšak s rostoucí koncentrací kopulačního činidla roste také žluté vybarvení pozadí řezů, hlavně po fixaci glutaraldehydem. Navíc při vyšší koncentraci hexazotizovaného p-rosanilinu je nebezpečí silnější inhibice kyselých fosfatázy.

Pokud pracujeme s pletivými s vysokou aktivitou kyselých fosfatázy, doporučuje se vyšší pH inkubačního média a zvýšení koncentrace diazoniové soli pro zvýšení rychlosti azokopulace, i když získáme silnější žluté vybarvení pozadí. Naopak při nižším pH a nižší

koncentraci diazoniové soli bude pozadí řezů čiré a místa s nižší enzymatickou aktivitou budou snadněji zobrazena, avšak místa s vysokou aktivitou budou zbarvena difúzně.

Příprava hexazonium-p-rosanilinu

roztok A

bazický fuchsin (kvalita pro Schiffovo reagens)	400 mg
rozpustit v destilované vodě	8 ml
<u>koncentrovaná HCl (36%)</u>	<u>2 ml</u>

míchat do rozpuštění a filtrovat

roztok lze skladovat po měsíce při uložení v ledniče při 4°C

roztok B

4% NaNO₂

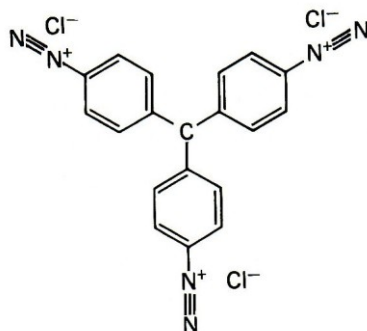
roztok lze skladovat max. 1 týden při uložení v ledniče při 4°C.

Těsně před použitím smícháme stejné objemy roztoku A a roztoku B.

Pokud je barvivo dobré kvality, směs krátce po přidání dusitanu zežloutne. Hnědé zbarvení ukazuje na špatnou kvalitu barviva nebo na nedokonalou diazotaci, či ztrátu HCl.

Výsledkem inkubace s takovou směsí jsou neuspokojivé výsledky (Lojda a kol. 1979).

hexazonium p-rosanilin



Inkubační médium

naftol AS BI nebo AS-TR-fosfát	20 – 25 mg
rozpustit v N,N-dimethylformamidu (DMFA)	1 ml

pufrovaný hexazotizovaný p-rosanilin (nebo new fuchsin), pH5 – 5,5
(připraví se smícháním 2 ml hexazotizovaného-p-rosanilinu
a 48 ml 2% acetátu sodného)

50 ml

pečlivě zamíchat a po chvíli stání zfiltrovat

Výsledek: Místa s aktivním enzymem jsou zbarvena červeně.

Literatura:

1. Beneš K., Lojda Z. and Hořavka B. (1961): A contribution to the histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in plants. – Histochemie 2: 313 – 320.
2. Gahan P.B. (1984): Plant Histochemistry and Cytochemistry. – 301 pp., Academic Press London etc.
3. Lojda Z., Gossrau R. and Schiebler T.M. (1979): Enzyme histochemistry. A Laboratory manual. – 339 pp., Springer Verlag, Berlin etc.