

# Detekce aktivity askorbát peroxidasy v polyakrylamidovém gelu

## TEORETICKÝ ÚVOD

Askorbát peroxidasa (APX) je enzym zodpovědný za detoxifikaci peroxidu vodíku u rostlin. U rostlin se vyskytují tři izoenzymové formy lišící se lokalizací v buňce. Všechny askorbát peroxidasy katalyzují reakci:



Role askorbát peroxidasy při obranné reakci byla podpořena pozorováními, že její aktivita narůstá při aplikaci různých enviromentálních stresů. V některých případech však můžeme po infekci rostliny patogenem pozorovat drastický pokles její aktivity, který poté potencuje nekrózu buněk způsobenou převážně oxidačním stresem.

Využití nativní polyakrylamidové elektroforézy pro stanovování aktivit celé řady enzymů má převážně největší význam při studiu aktivace jednotlivých izoenzymových forem. Toto stanovení aktivity APX je založeno na schopnosti askorbátu redukovat nitro-blue tetrazolium (NBT) v přítomnosti *N,N,N',N'*-tetraethylendiaminu (TEMED) na nerozpustný barevný formazan. V přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  je APX schopna zabránit tvorbě formazanu díky velmi rychlé oxidaci askorbátu. Proto je aktivita APX pozorována na gelu jako achromatický proužek.

## Literatura

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

## **POSTUP PRÁCE**

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

### **Izolace askorbát peroxidasy**

*Roztoky:*

Izolační pufr (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA)

0,3 g tkáně vložte do třecí misky, zmrazte v tekutém dusíku a rozetřete v 0,6 ml izolačního pufru. Pufr přeneste do 1.5 ml zkumavky a centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C. Supernatant přeneste do nové 1.5 ml zkumavky a opět centrifugujte při 20 000 x g 40 min při 4°C. Odsajte supernatant a uchovávejte ho na ledu.

### **Příprava polyakrylamidového gelu**

*Roztoky:*

Elektroforetický pufr (Tris-Glycin (pH=8.8), 2 mM askorbát)

Nalítý gel propláchněte vodou a vložte do elektroforetické vaničky. Nalijte do vaničky elektroforetický pufr obsahující 2 mM askorbát a spusťte elektroforézu na 30 minut při konstantním proudu 15 mA/gel. Elektroforézu provádějte při 4°C.

### **Příprava a nanesení vzorků**

Smíchejte 60 ul enzymového izolátu s 12 ul nanášecího pufru. Na gel nanášejte 15 ul a 30 ul jednotlivých izolátů v následujícím pořadí:

Gel č.1(15 ul izolátu): voda 0h, voda 12h, voda 24 h, mezera, cry 0 h, cry 12 h, cry 24h

Gel č.2(30 ul izolátu): voda 0h, voda 12h, voda 24 h, mezera, cry 0 h, cry 12 h, cry 24h

Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4°C.

### **Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu**

*Roztoky:*

Ekvilibrační pufr I (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 2mM askorbát)

Ekvilibrační pufr II (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 4mM askorbát)

Promývací pufr (50 mM fosfátový pufr (pH=7.0))

Detekční pufr (50 mM fosfátový pufr (pH=7.8), 28 mM TEMED, 2.45 mM NBT)

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě. Ekvilibrujte gel 30 min v ekvilibračním pufru I, který každých 10 minut vyměňte. Poté inkubujte gely 20 minut v ekvilibračním pufru II, do kterého přidejte 4,5 ul peroxidu vodíku. Poté gel promyjte + min v promývacím pufru a ponořte ho do detekčního pufru. Aktivita askorbát peroxidasy bude detekována jako achromatický proužek na tmavém pozadí.

### **VYHODNOCENÍ**

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci cryptogeinu ve srovnání s kontrolou (voda) v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.