

Jméno a UČO:

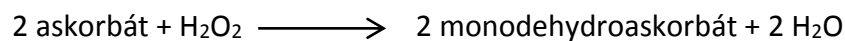
Datum:

ÚLOHA A

Analýza izoenzymů askorbát peroxidasy pomocí nativní PAGE

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 environmentálních 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 H₂O₂ je APX schopna zabránit tvorbě formazanu díky velmi rychlé oxidaci askorbátu. Proto je aktivita APX pozorována na gelu jako achromatický proužek.

POSTUP PRÁCE

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

Izolace askorbát peroxidasy

1. 0,3 g dříve před drcené rostlinné tkáně smíchejte s 0,6 ml izolačního pufru (100 mM fosfátový pufr (pH=7.0), 5 mM askorbát, 1 mM EDTA) a dobře zvortexujte.
2. Homogenát centrifugujte při 12 000 x g 5 min při 4°C.

Úloha A – Analýza izoenzymů askorbát peroxidasy pomocí nativní PAGE

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

Příprava polyakrylamidového gelu

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

Příprava a nanesení vzorků

1. Smíchejte 60 µl enzymového izolátu s 12 µl nanášecího pufru.
2. Na gel nanášejte 15 µl jednotlivých izolátů
3. Elektroforézu provádějte při konstantním proudu 15 mA/gel po dobu 2 hodin při 4 °C.

Detekce aktivity askorbát peroxidasy v gelu

Všechny následující kroky budou prováděny při pokojové teplotě.

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

VYHODNOCENÍ

- Srovnajte změny aktivity askorbát peroxidasy po aplikaci jednotlivých látek v závislosti na čase.
- Výsledek zdůvodněte.