

Vysoce účinná kapalinová chromatografie jako nástroj pro detekci fytochelatin syntázy

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY FOR DETECTION OF PHYTOCHELATIN SYNTHASE

Ondřej Zítka¹, Olga Kryštofová¹, Natalia Cernei¹, Vojtěch Adam¹, Jaromír Hubálek¹, Libuše Trnková², Miroslava Beklová³, René Kizek¹
¹Mendelova univerzita v Brně; ²Masarykova univerzita; ³Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

Fytochelatin (PCs) jsou post-translačně syntetizované polythioly, hrající důležitou roli v detoxikaci těžkých kovů. Poprvé byly popsány v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* a dále pak v rostlinách a řasách. Celá rodina fytochelatinů se skládá z dipeptidické repetice γ -Glu-Cys, která se může opakovat 2–11 \times (nejčastěji ale 2–5 \times) a je zakončena aminokyselinou Gly. Existují i strukturální analogy přítomné pouze v určitých organismech, které mají místo Gly jinou aminokyselinou (Ala, Ser a Glu), nebo nejsou terminovány třetí aminokyselinou vůbec. Takové látky se označují desglycin fytochelatin (Des-Gly-PC). PCs jsou neribozomálně enzymaticky syntetizovány z glutathionu pomocí fytochelatin syntázy (PCS). Cílem předkládané práce bylo optimalizovat snadnou přípravu vzorku s následnou detekcí pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) pro stanovení fytochelatinů v rostlinných pletivech jako nového ukazatele aktivity fytochelatin syntázy.

Materiál a metody

HPLC-ED systém se skládá ze dvou chromatografických pump a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 \times 4,6; velikost částic 3,5 μ m, Agilent Technologies, USA). K detekci jsme použili elektrochemický dvanácti-kanálový detektor. Vzorek (20 μ l) byl injektován automaticky pomocí autosampleru. Kolona byla termostátována na 30 $^{\circ}$ C. Pro stanovení aktivity PCS bylo odebíráno 200 mg suspenze tabákových buněk BY-2. Buněky byly promyty 20 mM fosfátovým pufrem (pH 7,5) a ve stejném pufru a prostředí 1 mM dithiothreitolu homogenizovány pomocí pístového homogenizátoru (10 min, na suchém ledu). Následně byly homogenáty centrifugovány při 14 000 g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C. Potom byl k 100 μ l supernatantu přidán substrát enzymové reakce (100 mM redukovaný glutation – GSH) a kov pro aktivaci enzymu (50 μ M Cd(NO₃)₂). Takto nachystané vzorky byly 15 minut inkubovány při teplotě 35 $^{\circ}$ C. Po přidání 20 μ l 30% 5-sulfosalicylové kyseliny byla enzymová reakce ukončena.

Výsledky a diskuse

Schopnost rostliny přežít v prostředí kontaminovaném těžkými kovy zahrnuje spuštění řady biochemických procesů, od selektivního příjmu anorganických látek z půdy až po intracelulární mechanismy obrany. Jedním z hlavních obranných mechanismů je syntéza na cystein bohatých rostlinných peptidů zvaných fytochelatin. Pro jejich identifikaci a kvantifikaci jsou vyvíjeny a optimalizovány metody vysoce účinné kapalinové chromatografie s různými typy detekce. Díky vysokému obsahu thiolové skupiny jsou velmi výhodné detektory elektrochemické. V naší práci jsme se zaměřili na aplikaci vysoce účinné kapalinové

chromatografie s elektrochemickou detekcí pro stanovení fytochelatinů (PC₂, PC₃, PC₄ a PC₅) a dvou dalších významných thiolových sloučenin, redukovaného (GSH) a oxidovaného glutathionu (GSSG). Aktivita PCS byla sledována v homogenátu připraveném z buněk suspenzní kultury tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. BY-2). Tabákové buňky byly kultivovány tři dny v Murashige-Skoog-médiu, které obsahovalo 0, 5 a 10 μ M Cd(NO₃)₂. Po ukončení kultivace bylo stanoveno množství fytochelatinu v homogenátu buněk (příprava homogenátu viz. sekce Materiál a metody). Dále jsme v těchto homogenátech aktivovali PCS. Je známo, že -SH skupinu obsahující peptidy mohou během přípravy a analýzy reálného vzorku oxidovat za vzniku disulfidických -S-S- skupin. Z redukovaných forem peptidů, jako je GSH, vznikají během přípravy vzorku konjugáty GSSG, čímž se snižuje koncentrace stanovovaných redukovaných peptidů. V případě, že peptid obsahuje více -SH skupin jako fytochelatin PC₂, mohou navíc kromě PC-konjugátů vznikat intramolekulární disulfidické vazby. Chromatografický záznam homogenátu připraveného z buněk kultivovaných 3 dny v médiu obsahující 5 μ M Cd(NO₃)₂ jasně ukazuje nárůst koncentrace detekovaných fytochelatinů. Aktivita enzymu byla určována jako ekvivalent syntetizovaného fytochelatinu PC₂ v aktivovaném homogenátu oproti homogenátu, který aktivován nebyl. Z analýzy buněk, které byly ovlivněny přidávkou Cd(NO₃)₂ vyplývá, že koncentrace fytochelatinu PC₂ narůstá v závislosti na zvyšující se koncentraci kovu v kultivačním médiu a aktivita PCS zůstává bez ohledu na to, zda byl do média přidán Cd(NO₃)₂, přibližně na stejné úrovni, což svědčí o funkčnosti PCS enzymatického aparátu buňky i v přítomnosti toxických iontů kadmia v průběhu kultivace buněk.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem IGA TP 1/2010, IGA MENDELU 7/2010, INCHEMIBOL MSM0021622412 a MSMT 6215712402.

Zítka O., Kryštofová O., Cernei N., Adam V., Hubálek J., Trnková L., Beklová M., Kizek R.: High performance liquid chromatographic assay for detection of phytochelatin synthase

Phytochelatin are sulphur-rich peptides able to detoxify heavy metals. Their synthesis is catalyzed by the enzyme called phytochelatin synthase. In this study, we used high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) for sensitive determination of phytochelatin and phytochelatin synthase activity. Chromatographic conditions were optimized. Phytochelatin synthase activity was determined in homogenate prepared from cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. BY-2). The enzyme was induced by 50 μ M Cd(NO₃)₂. As a substrate,

we used 100 mM reduced glutathione (GSH). Enzyme activity was determined as the equivalent of synthesized phytochelatin after an incubation lasting 15 minutes. Phytochaltins were detected in the reaction mixture by HPLC-ED. The results obtained show that the optimized HPLC-ED method is suitable not only for detection of low concentrations of phytochelatin, but also for determination the activity of phytochelatin synthase.

Key words: glutathione, phytochelatin, phytochelatin synthase, high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED).

Kontaktní adresa – Contact address:

doc. Ing. René Kizek, Ph. D., Mendelova univerzita, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika; e-mail: kizek@sci.muni.cz