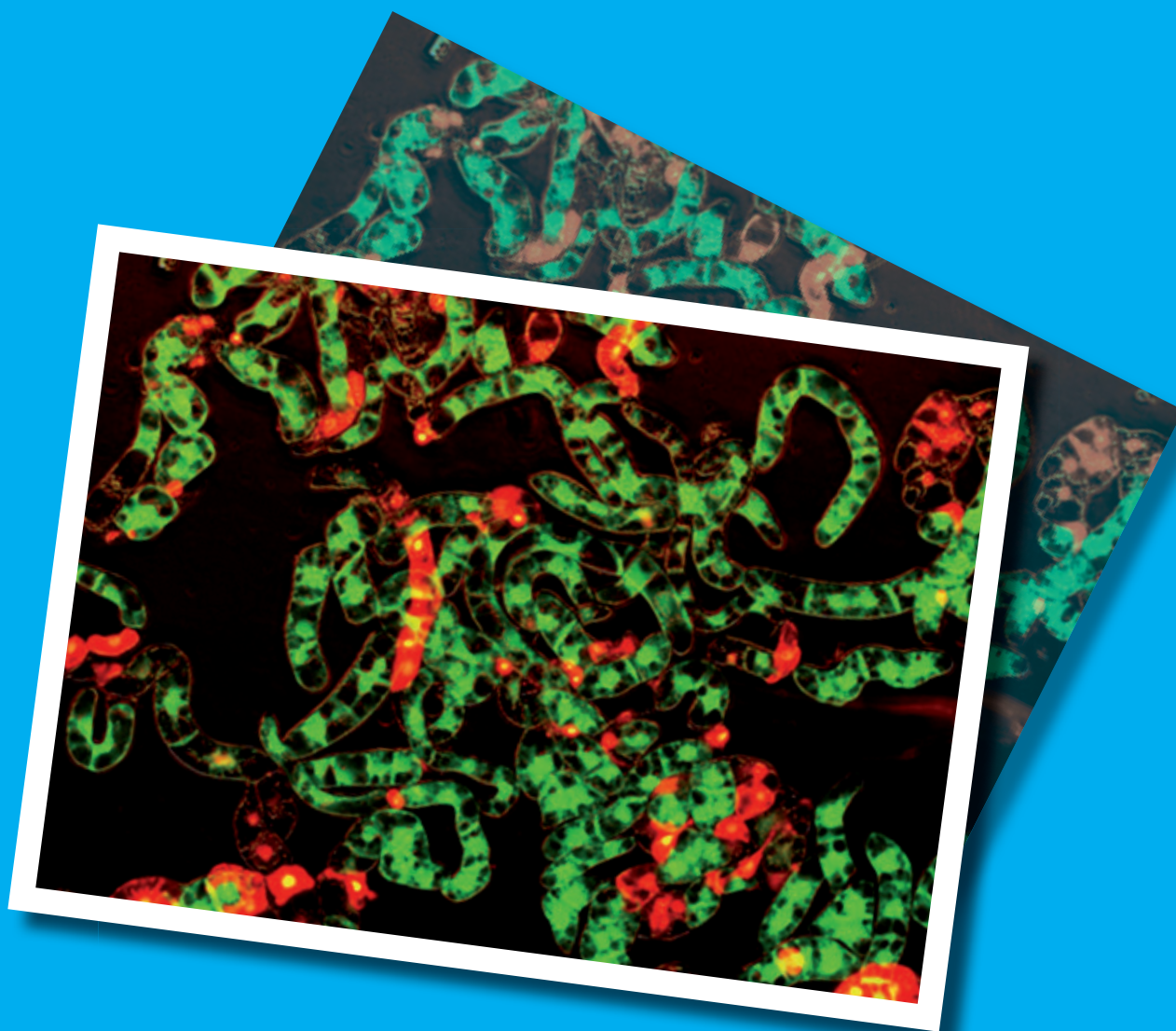


Mendelova univerzita v Brně
Vysoké učení technické v Brně



METODIKA STANOVENÍ FYTOCHELATINSYNTÁZY PRO HODNOCENÍ STRESU TĚŽKÝMI KOVY

Ondřej ZÍTKA et al.

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta

Vysoké učení technické v Brně, Středoevropský technologický institut v Brně

METODIKA STANOVENÍ FYTOCHELATINSYNTÁZY PRO HODNOCENÍ STRESU TĚŽKÝMI KOVY

Ondřej **ZÍTKA** et al.

BRNO, 2013

Metodika stanovení fytochelatinsyntázy pro hodnocení stresu těžkými kovy

(metodická pomůcka pro praxi)

Lektorovali:

Doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D. – Univerzita Obrany, Hradec Králové

Ing. Jiří Kolouch – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Tato publikace vznikla z výsledků řešení grantu QJ1310100 „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ financovaného národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV) a výsledků infrastrukturního projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0068 CEITEC - Středoevropský technologický institut, centrum excelentní vědy“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. A také za podpory „Lead and Cadmium Initiatives, United Nations Environment Programme“.

Doporučená citace:

Zítka, O., Komínková, M., Kryštofová, O., Adam, V., Skládanka, J., Havlíček, Z., Zehnálek, J., Merlos Rodrigo, M.A., Beklová, M., Kizek R.: Metodika stanovení fytochelatinsyntázy pro hodnocení stresu těžkými kovy. Mendelova univerzita v Brně, 2013, 21 s. ISBN 978-80-7375-700-7

(Na obálce je fotografie - Odlišení životnosti tabákových buněk (BY-2) pomocí dvojitého barvení fluoresceindiacetátem a propidium jodidem. Foceno fluorescenčním mikroskopem Olympus IX71)

© Vysoké učení technické v Brně (CEITEC) a Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ISBN: 978-80-7375-700-7

2013



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI





United Nations Environment Programme
Chemicals

UNEP

Lead and Cadmium Activities

Tato práce vznikla pro účely programu UNEP Lead and Cadmium Activities. Navržená metoda je vhodná pro velmi rychlé a intenzivní monitorování efektu těžkých kovů v životním prostředí.



UNEP

United Nations Environment Programme

OBSAH

ABSTRAKT.....	6
ÚVOD	7
I. CÍL METODIKY.....	10
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	10
2.1 Suspenzní kultura a její příprava.....	10
2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí	10
2.3 Příprava buněk pro analýzu.....	10
2.4 Optimalizace stanovení PCS	10
2.4.1 Kalibrace	10
2.4.2 Koncentrace substrátu GSH.....	10
2.4.3 Doba inkubace.....	12
2.5 Stanovení aktivity PCS.....	12
2.5.1 Vlastní stanovení.....	12
2.6 Stanovení obsahu kadmia v buněčné kultuře.....	12
2.7 Stanovení esterázové aktivity	14
2.8 Vyhodnocení PCS	14
2.8.1 Linearizace (charakterizace kultury).....	14
III. APLIKACE NA REÁLNÉ VZORKY	16
3.1 Příprava rostlin	16
3.2 Příprava vzorku pro analýzu PCS	16
3.3 Výsledky.....	16
IV. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....	17
V. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....	17
VI. EKONOMICKÉ ASPEKTY	17
VII. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	18
VIII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	20
IX. DEDIKACE A PODĚKOVÁNÍ.....	21

Abstrakt

V životním prostředí se díky působení člověka nachází těžké kovy jako je kadmium, olovo, rtuť, bismut a další ve velkém, někdy až kriticky nadbytečném množství. Rostliny se oproti živočichům mohou těmto kovům různými mechanismy lépe bránit. Jedním z mechanismů je syntéza fytochelatinů (PCs). PCs jsou peptidy schopné na sebe vázat těžké kovy. Jejich syntéza je katalyzována enzymem fytochelatinsyntázou (PCS). Předložená metodika přináší ucelený postup pro stanovení aktivity fytochelatinsyntázy, který využívá analýzu primárního produktu enzymové reakce fytochelatinu2 (PC2) pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Ke stanovení PCS byly použity buňky tabáku BY-2, které byly kultivovány s přidavkem 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Pro potvrzení výsledků a jejich výklad byla provedena analýza skutečného obsahu kadmia v buňkách pomocí elektrochemického stanovení a také esterázová aktivita fluorimetrickou detekcí.

Klíčová slova:

fytochelatinsyntáza, suspenzní tabákové buňky BY-2, těžké kovy, kadmium

Abstract

There are numerous heavy metals such as cadmium, lead, mercury, bismuth or others increased in higher or even in critical quantity due to human effect. Plants are able to be more resistant to these metals in comparison to animals. It is due to one of the most evolved mechanism as synthesis of phytochelatins (PCs). The PCs peptides are able to heavy metal binding. Its synthesis is catalysed by enzyme called Phytochelatin Synthase (PCS). Here proposed methodics covers a complete approach for PCS activity assay which is possible due to determination of product of enzyme reaction which is phytochelatin2 (PC2) using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED). For determination of PCS activity tobacco cells BY-2, which were cultivated under treatment of 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ were used. For confirmation of the results obtained the electrochemical determination of total Cd and fluorimetric assay of esterases were carried out.

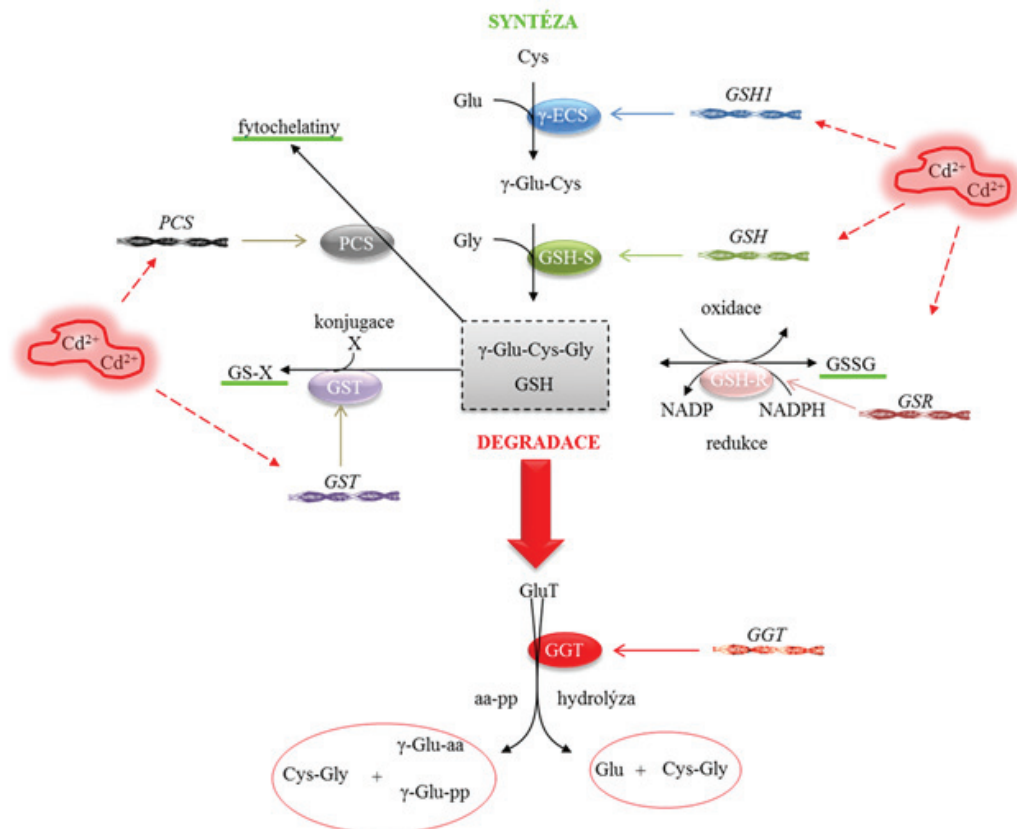
Keywords:

fytochelatin synthesis, suspension tobacco cells BY-2, heavy metals, cadmium

Úvod

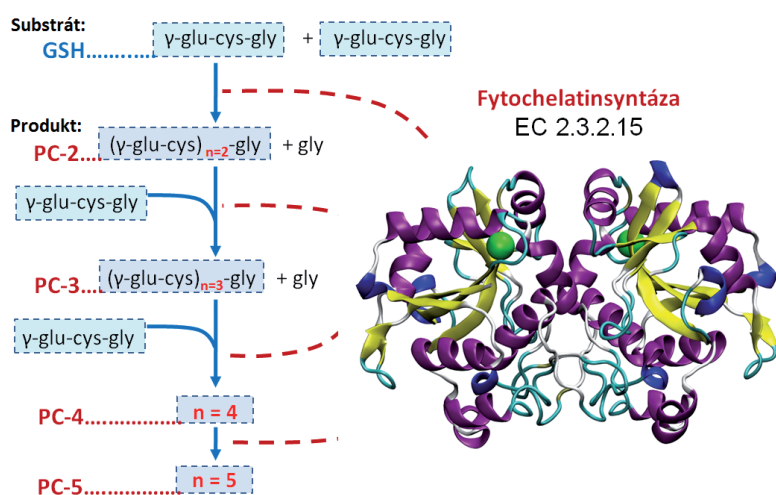
Program OSN pro životní prostředí (UNEP) je speciální instituce Organizace spojených národů, která vykonává celosvětovou kontrolu nad životním prostředím, včetně aktivit spojených se správným nakládáním s chemikáliemi. Jedno z posledních doporučení UNEP bylo věnováno olovu a kadmii jako zástupcům nebezpečných látek. Tyto těžké kovy mohou ovlivnit mnohé biochemické a biologické pochody v bakteriálních, rostlinných a živočišných buňkách. Většina organismů si proto vyvinula specifické ochranné mechanismy, jako je syntéza na cystein bohatých sloučenin, mezi které patří glutathiony, fytochelatiny nebo metalothioneiny (Clemens, et al. 2009). Glutathion (GSH) je tri-peptid složený z aminokyselin kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu, patří mezi nejhojnější nízkomolekulární thiolové látky ve všech eukaryotických organismech (Dixon, et al. 1998), (Dubreuil-Maurizi, et al. 2011), (Foyer, et al. 1997), (Foyer and Noctor 2011). V rostlinách se GSH podílí na celé řadě buněčných procesů, včetně ochrany proti reaktivním formám kyslíku (ROS) a těžkým kovům a umožňuje detoxifikaci cizorodých látek (Seth, et al. 2012). Dále má GSH důležitou roli v regulaci buněčného dělení a vývojových procesů např. květu. GSH je také důležitý v transportu a ukládání redukované síry a jako signální molekula (Foyer, et al. 2001). Syntéza GSH probíhá pomocí dvou ATP-dependentních reakcí. γ -glutamylcystein syntetáza (GSH1, EC 6.3.2.2) katalyzuje vytvoření peptidové vazby mezi

karboxylovou skupinou kyseliny glutamové a aminoskupinu cysteinu za vzniku γ -glutamylcysteinu (γ -EC). Ve druhé reakci, glutathion syntetáza (GSH2, EC 6.3.2.3) spojuje zbytek glycinu s γ -EC za vzniku GSH. Oba enzymy, GSH1 a GSH2 se vyskytují u *Arabidopsis thaliana* a *Brassica juncea* v plastidech, s tím, že GSH2 byl zjištěn i v cytosolu ((Anjum, et al. 2012), (Liu, et al. 2012), (May, et al. 1998), (Ohkama-Ohtsu, et al. 2009), (Szalai, et al. 2009), (Yadav 2010)). Glutathion existuje ve dvou podobách, a to jako redukovaný glutathion (GSH) a oxidovaný glutathion (GSSG) (Szalai, et al. 2009). Redukční potenciál glutathionu závisí na poměru intracelulárního GSH/GSSG. Změna redoxního poměru glutathionu závisí hlavně na pH, celkové intenzitě biosyntézy a katabolismu GSH (Yadav 2010). Glutathiony jsou základními jednotkami tvořící komplexnější struktury, jež se nazývají fytochelatiny (Obr. 1). Fytochelatiny (PCs) (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly ($n = 2$ až 11) se podílejí na detoxikaci těžkých kovů a jsou jedním z nejméně studovaných rostlinných stresových peptidů. Pokud nejsou buňky ohroženy akutní toxickou dávkou, jsou schopny vázat těžké kovy pomocí -SH skupiny cysteinových jednotek a následně je transportovat do vakuoly (di Toppi and Gabrielli 1999), (Cobbett 2000a), (Zenk 1996), (Cobbett and Goldsbrough 2002), (Grill, et al. 1985). Rovněž bylo prokázáno, že fytochelatinový mechanismus detoxikace těžkých kovů není omezen jen na rostliny a některé houby, ale vzácně se vyskytuje i u zvířat. Dále bylo zjištěno, že gen *ce-pcs-1* hliště hádátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) kóduje funkční PC syntázu, jejíž činnost je rozhodující pro toleranci těžkých kovů v organismu (Cobbett 1999), (Vatamaniuk, et al. 2001).



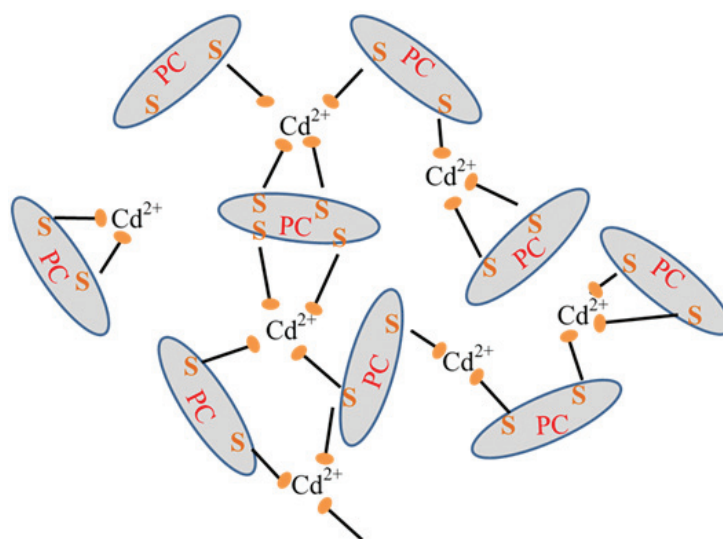
Obrázek 1. Syntéza a degradace glutathionu v rostlinách. Glutathion (GluT) je syntetizován v cytosolu a chloroplastech pomocí gama-glutamylcystein syntetázy g(ECS) kodované genem GSH1 a glutathion syntetázy (GSH-S) kodované genem GSH. Jako antioxidant se glutathion oxiduje na GSSG. Díky působení glutathion reduktázy (GSH-R) kódované genem (GSR) se GluT vyskytuje ve své redukované formě (GSH) a to především v cytosolu, mitochondriích a chloroplastech. GluT má schopnost detoxifikovat xenobiotika a to díky glutathion-S-transferáze (GST), která zajišťuje vazbu mezi Glu a xenobiotikem - (X) za vzniku konjugátu GS-X. GST je kódována velkým množstvím GST genů, které mohou být exprimovány i Cd ionty nebo H₂O₂. Glutathion je také substrátem pro enzym fytochelatinsyntázu (PCS), která umožňuje tvorbu fytochelatinů. Degradace GluT se uskutečňuje pomocí gama-glutamyl transpeptidázy (GGT) kódované geny GGT1-4. Hydrolýza GluT na kyselinu glutamovou (Glu) a dipeptid cysteinylglycin (Cys-Gly). Degradace GluT přes aminokyselinový nebo peptidový receptor (aa-pp) za vzniku gama-glutamylové aminokyseliny a dipeptidu Cys-Gly. Obrázek byl upraven podle (Foyer, et al. 2001).

Syntéza fytochelatinů z glutathionu je katalyzována enzymem fytochelatinsyntázou (PCS) (γ -Glu-Cys dipeptidyl transpeptidásou) (EC 2.3.2.15) (Obr. 2).



Obrázek 2. (nahore) Schéma syntézy fytochelatinů (PCs) pomocí enzymu fytochelatinsyntáza při syntéze fytochelatinů. Molekula GSH je prekurzorem k syntéze PC-2 který, je primárním produktem.

Obrázek 3. (vpravo) Interakce PCs s kadmennými ionty. PCs váží Cd²⁺ pomocí -SH skupin z aminokyseliny cysteinu. Cd²⁺ mohou vytvářet s -SH skupinami různé komplexy. Obrázek upraven podle (Pal and Rai 2010).



Primárním mechanismem detoxifikace těžkých kovů je jejich chelatace pomocí PCs a rovněž za účasti antioxidantního systému zastoupeného enzymy jako je superoxid dismutáza, guajakol peroxidáza, askorbát peroxidáza či glutathion reduktáza, brání rostlinu před volnými radikály, které vznikají působením těžkých kovů (Cobbett and Goldsbrough 2002; Pal and Rai 2010). PCs interagují s těžkými kovy prostřednictvím tiolových skupin (-SH), které má ve své struktuře cystein (Pal and Rai 2010). Stupeň polymerace ve struktuře fytochelatinu roste s koncentrací intracelulárního kovu indukujícího zvýšení vazebné stability celého PCs-kov komplexu (Padmavathiamma and Li 2007). Vytvoření komplexu PCs-kov souvisí s dostupností ligandů, kinetikou vznikajícího komplexu a sterickými faktory. Strukturální model komplexu PC-Cd ukazuje, že vazebná stechiometrie atomů síry může být buď z jedné nebo více molekul fytochelatinu (4 až 1), a vytváří tak amorfní komplexy (Obr. 3) (Cobbett 2000b). Komplex kov-PCs se označuje jako nízko molekulární komplex (low molecular weight – LMW). Tento komplex je transportován do vakuoly za účasti transportéru HMT1, (heavy metal tolerance factor 1), patřící do velké rodiny transportních proteinů ABC (Ortiz, et al. 1992; Ortiz, et al. 1995).

Po vstupu do vakuoly je LMW komplex transformován na vysoko molekulární komplex HMW (high molecular weight) pomocí vazby přes -S-S- skupiny (Najmanova, et al. 2012; Supalkova, et al. 2007). Stres generovaný částečnou akumulací Cd v listech *Triticum aestivum* je potlačován antioxidační odpovědí a biosyntézou PCs (Ranieri, et al. 2005). Pokud však dojde k akumulaci nadměrného množství Cd iontů, vzroste prudce koncentrace H₂O₂ i přes zvýšené množství dostupných PCs a ostatních tiolových látek (Ranieri, et al. 2005). Existují ekotypy, které jsou tolerantní k těžkým kovům i přesto, že syntetizují méně PCs než ekotypy senzitivní. Rostlina *Sedum alfredii* u níž bylo pozorováno, že pokud rostla ve starém dole, kde byla půda kontaminována vysokou koncentrací olova a zinku, měla vysokou míru tolerance na tyto kovy, oproti stejným druhům rostoucím mimo tyto oblasti (Pal and Rai 2010). Mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, které měly narušenou syntézu PCs jasně prokázaly významnou roli PCs v detoxifikaci těžkých kovů. Mutant (cad1), který nemá gen pro PCS, izolovaný z EMS-mutagenních (mutagenní látka - Ethyl methanesulfonate) rostlin F2 populace, byl hypersenzitivní k iontům Cd (Cazale and Clemens 2001; Howden and Cobbett 1992; Howden, et al. 1995; Lee, et al. 2003). Tento mutant není schopen růst v přítomnosti 30 mM Cd oproti WT rodičům, což způsobuje recesivní mutace genu souvisejícího se syntézou PCs. Těžké kovy tak významně ovlivňují syntézu tiolových sloučenin (Babula, et al. 2008; Hasan, et al. 2009; Rai 2008; Shah and Nongkynrih 2007). Aktivita PCS v rostlinné buňce vystavené těžkým kovům může být studována stanovením fytochelatinů pomocí elektrochemických metod, které jsou vysoce citlivé a ve spojení se separační metodou jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Diopan, et al. 2010), (Zitka, et al. 2011b) (Lawrence, et al. 2002), (Trojanowicz, et al. 2003), (Zehnalek, et al. 2004a), (Zehnalek, et al. 2004b), (Petrlova, et al. 2006), (Potesil, et al. 2005), (Vignaud, et al. 2004), (Vandeberg and Johnson 1993), (Minocha, et al. 2008), (Bramanti, et al. 2006), (Elviri, et al. 2010), (Sadi, et al. 2008), (Zitka, et al. 2010b), (Shestivska, et al. 2010), (Zitka, et al. 2011a), (Zitka, et al. 2011b), (Zitka, et al. 2010a), kapilární elektroforéza (Fanguy and Henry 2002), (Minami, et al. 2002) a nebo kapilární kapalinová chromatografie (Deng, et al. 2003), jsou rovněž selektivní.

I. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je vytvořit ucelený postup stanovení fytochelatinsyntázy pro zjištění odolnosti rostlinných buněk vůči vlivu těžkých kovů. Do celé metodiky jsou zahrnuty i stanovení parametrů jako skutečný obsah kadmia (stanoveno pomocí diferenční pulsní voltametrie) a stanovení aktivity esteráz (fluorimetrickou detekcí).

II. Vlastní popis metodiky

2.1 Suspenzní kultura a její příprava

Suspenzní kultura *Nicotiana tabacum* cv. BY 2 byla kultivována podle Nagata et al (Nagata, et al. 1992) v médiu Murashige and Skoog (MS medium Micro and Macro elements, Duchefa, Holandsko) s přidavkem sacharózy (30 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (0,2 g.l⁻¹), thiaminu (1 mg.l⁻¹) a 2,4-dichlorophenoxyoctové kyseliny (0,2 mg.l⁻¹) (vše z Duchefa, Testováno na rostlinách, Holandsko). Suspenzní kultury o objemu 20 ml byly kultivovány v 50 ml Erlenmayerových baňkách při 27 °C a třepání na 135 rpm (ES-20, Biosan, Lotyšsko). Subkultivace kultury probíhala tak, že po 3 a 4 dnech byly přeneseny 1 až 2 ml suspenzní kultury do čerstvého média o celkovém objemu 20 ml. K 1 den staré kultuře bylo přidáno 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM Cd(NO₃)₂. Kultivace pokračovala další tři dny při 27 °C a třepání na 135 rpm.

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah 0,001-9,999 ml.min⁻¹) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 × 4,6; 3,5 μm velikost částic, Agilent Technologies, USA) a dvanácti-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA), který byl složen ze tří průtočných analytických komůrek (Model 6210, ESA, USA). Každá komůrka obsahovala čtyři analytické cely. Jedna analytická cela obsahovala dvě referenční (hydrogen paladiové), dvě pomocné a jednu porézní grafitovou pracovní elektrodu. Elektrochemický detektor byl uložen v řídicím modulu, jehož celý prostor byl termostatován. Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru (Model 542, ESA, USA), který měl v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Vzorky byly během analýzy uchovány v karuselu při teplotě 8 °C. Jako mobilní fáze byly použity A: kyselina trifluoroctová (80 mM) a B: 100% metanol. Pro stanovení byla použita gradientová eluce 0→1 min (3 % B), 1→12 min (20 % B), 12→15 min (98 % B), a 15→20 min (98 % B).

2.3 Příprava buněk pro analýzu

Ze vzorků buněk s přidavkem Cd 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM bylo odebráno 10 ml kultivačního média s obsahem BY-2 buněk, které byly následně centrifugovány (Eppendorf 5804, USA) při 2000 g, 24 °C po dobu 20 min. Vzniklý supernatant byl odstraněn a precipitát buněk byl promyt fosfátovým pufrům (20 mM, pH 7,5). Tento promývací krok byl zopakován třikrát, aby bylo dosaženo odstranění živního média z buněk. Následně bylo odebráno 200 μg buněk, které byly za pomoci kapalného N₂ rozdrčeny v třecí misce (2 min). Poté byly buňky další 2 min třeny s přidavkem 800 μl 20 mM fosfátového pufru (pH 7,5) s 1 mM tris(2-karboxyetyl)fosfinem (TCEP). Vzniklý homogenát byl centrifugován (16400 g, 4 °C, 15 min) (Eppendorf 5417R, USA). Odebraný supernatant byl analyzován.

2.4 Optimalizace stanovení PCS

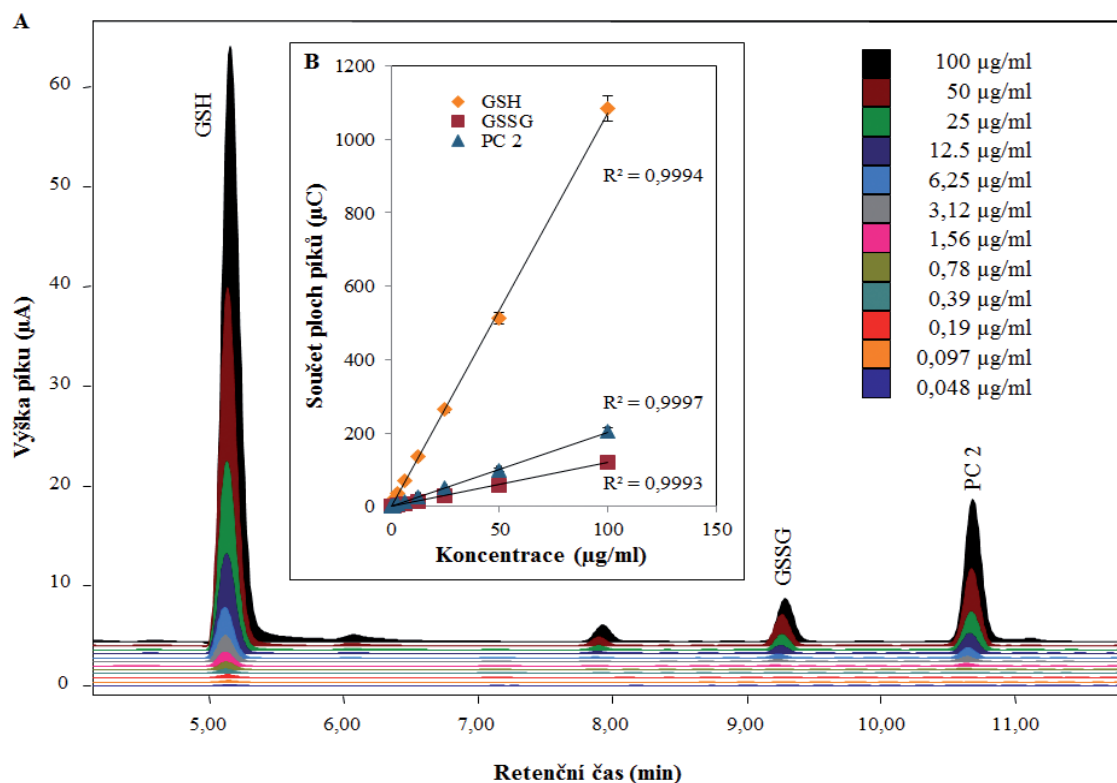
2.4.1 Kalibrace

Kalibrace byla připravena pro PC2 a pro GSH a GSSG. Proložení záznamů a kalibrační křivky jsou uvedeny na (Obr. 4). Z této kalibrace je patrné, že se zvyšující se koncentrací thiolů se zvyšuje i intenzita signálu. Kalibrační křivky byly lineární v rozmezí 0,05 - 100 μg.ml⁻¹ (GSH), 0,2 - 100 μg.ml⁻¹ (GSSG) a 0,1 - 100 μg.ml⁻¹ (PC2). Rozsah kalibrace zahrnuje koncentrace cílových molekul v reálném množství v buňkách, tyto hodnoty jsou srovnatelné s Diopan, et al. 2010 (Diopan, et al. 2010). Kromě toho je detekční limit thiolů stanoven pro GSH na 6 nM, GSSG na 26 nM a u PC2 na 17 nM. V porovnání s podobnou metodou (Diopan, et al. 2010) dosahujeme nižších hodnot. Další analytické parametry jsou uvedeny v (Tab. 1).

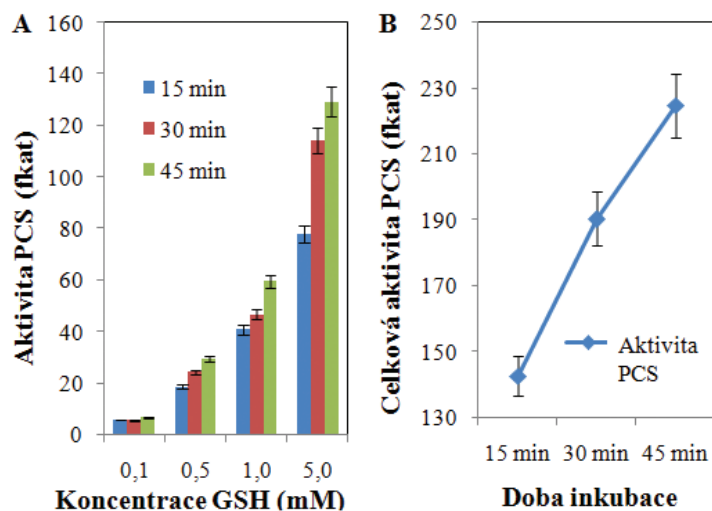
2.4.2 Koncentrace substrátu GSH

Přidáním substrátu enzymové reakce (GSH o koncentracích 5; 2,5; 1; 0,5; 0,3; 0,1; 0,05; 0 mM ve fosfátovém pufru (20 mM, pH 7,5)) a kovu pro aktivaci enzymu (50 μM CdCl₂) k 100 μl supernatantu byla připravena reakční směs vzorku. Souběžně s touto reakční směsí bylo přidáním 20 mM fosfátového pufru (pH 7,5) s 1 mM TCEP k 100 μl supernatantu zhotoven kontrolní vzorek. Takto nachystané vzorky byly 30 minut inkubovány při teplotě 35 °C a 300 rpm (Thermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf, USA) a následně k nim byly přidány 4 μl 30% 5-sulfosalicylové kyseliny, čímž byla enzymová reakce ukončena. Supernatant byl vždy přefiltrován pomocí membránového filtru (0,45 μm, Millipore, Billerica, Mass., USA). Vzniklý PC2 byl detekován pomocí optimalizované metody HPLC-ED.

Po vyhodnocení ploch píku získaných pomocí analýzy HPLC-ED byly tyto hodnoty přepočteny pomocí kalibrační křivky. Jak je vidět na (Obr. 5A) hodnoty nasyntetizované PC2 se s koncentrací substrátu enzymové reakce zvyšují. Pro další optimalizace byla tedy zvolena koncentrace GSH 5 mM.



Obrázek 4.: (A) HPLC-ED záznamy GSH, GSSG a PC2 při aplikovaném potenciálu 900 mV. Proložení chromatogramů kalibrační řady. (B) Závislost plochy HPLC-ED signálů GSH, GSSG a PC2 v závislosti na koncentraci.



Obrázek 5. (A) Vliv doby inkubace buněčného extraktu z BY-2 buněk s CdCl₂ (50 µM) a substrátem enzymové reakce (GSH 0,1, 0,5, 1 a 5 mM) na aktivitu PCS. (B) Hodnoty rovnic lineární regrese získané z předchozího grafu A.

2.4.3 Doba inkubace

Přidáním substrátu enzymové reakce (GSH 5 mM ve fosfátovém pufru (20 mM, pH 7,5)) a kovu pro aktivaci enzymu (50 μ M CdCl₂) k 100 μ l supernatantu byla připravena reakční směs vzorku. Souběžně s touto reakční směsí bylo přidáním 20 mM fosfátového pufru (pH 7,5) s 1 mM TCEP k 100 μ l supernatantu zhotoven kontrolní vzorek. Takto nachystané vzorky byly inkubovány při teplotě 35 °C a 300 rpm po dobu 15, 30 a 45 minut v termomixeru (Thermomixer comfort 1,5ml, Eppendorf, USA) a následně k nim byly přidány 4 μ l 30% 5-sulfosalicylové kyseliny, čímž byla enzymová reakce ukončena. Supernatant byl vždy přefiltrován pomocí membránového filtru (0,45 μ m, Millipore, Billerica, Mass., USA). PC2 byl detekován pomocí optimalizované metody HPLC-ED.

Po vyhodnocení ploch píku získaných pomocí analýzy HPLC-ED byly tyto hodnoty přepočteny pomocí kalibrační křivky. Jak je vidět na (Obr. 5B) aktivita fytochelatinsyntázy má vzrůstající trend s delší dobou inkubace. Pro další analýzy byla tedy zvolena doba inkubace 30 minut z důvodu zanedbatelného rozdílu mezi časy 30 a 45 minut. Z praktického důvodu je vhodnější kratší doba inkubace.

2.5 Stanovení aktivity PCS

2.5.1 Vlastní stanovení

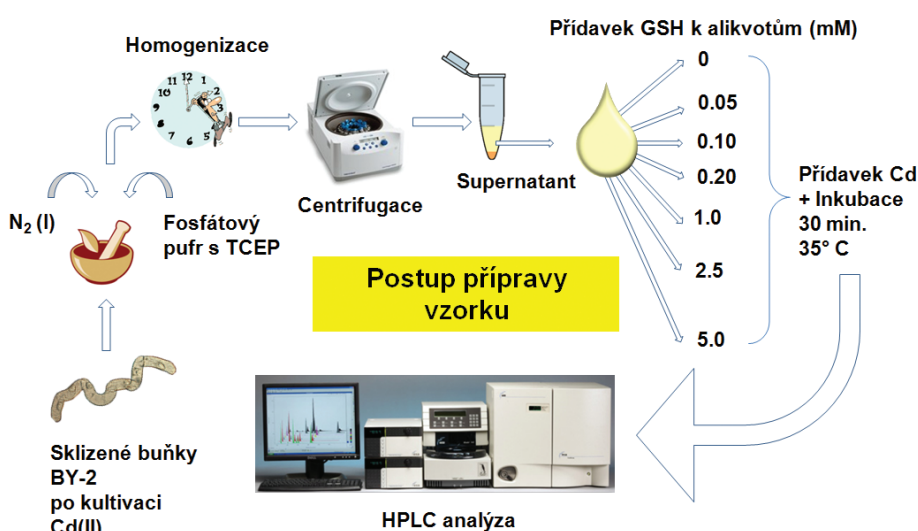
Reakční směs byla připravena přidáním substrátu enzymové reakce (GSH o koncentracích 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 a 5 mM ve fosfátovém pufru (20 mM, pH 7,5) s 1 mM TCEP) a kovu pro aktivaci enzymu (50 μ M CdCl₂) ke 100 μ l supernatantu získaného ze vzorku buněk. Souběžně byl přidáním 20 mM fosfátového pufru (pH 7,5) s 1 mM TCEP k 100 μ l supernatantu zhotoven kontrolní vzorek. Takto nachystané vzorky byly inkubovány v termomixeru při teplotě

35 °C po dobu 30 minut 300 rpm (Thermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf, USA) a následně k nim byly přidány 4 μ l 30% 5-sulfosalicylové kyseliny, čímž byla enzymová reakce ukončena. PC2 byl detekován pomocí optimalizované metody HPLC-ED. Množství PC2, nasynthetizovaného během inkubace, odpovídá aktivitě enzymu. Postup přípravy vzorku je uveden na (Obr. 6).

Metoda vykazuje 98% návratnost. Návratnost byla vypočítána metodou standardního přídatku, při které bylo k vzorku buněčného extraktu přidáno 50, 100 a 500 ng.ml⁻¹ standardu PC2. Výsledky jsou uvedeny v (Tab. 2). Opakovatelnost metody byla okolo 105 % (Tab. 3).

2.6 Stanovení obsahu kadmia v buněčné kultuře

Buňky BY-2 (průměrná navážka byla 0,2 g) byly promyty 0,1 M etylendiamin tetra-octovou kyselinou (EDTA) a pak byly upraveny pomocí mikrovlnného rozkladu Multiwave 3000 (Anton Paar, Germany). Byl použit tříkrokový rozkladný postup ((i) 120 s, 250 W; (ii) 120 s, 0 W (120 °C); (iii) 10 min 250 W (180 °C)) s přídatkem 5 ml 35 % HNO₃ a 3 ml vody. Čirý roztok byl kvantitativně převeden do nádoby a zředěn vodou na objem 8 ml.



Obrázek 6. Schéma přípravy biologického vzorku pro stanovení aktivity PCS. Buňky jsou nejdříve homogenizovány v třecí misce po jejich dezintegraci tekutým dusíkem. Po té následovala centrifugace. K odebranému supernatantu se přidá substrát GSH a aktivuje se PCS přidávkem kademnatých iontů.

Elektrochemická analýza byla provedena pomocí 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosamplerem (Metrohm, Švýcarsko), za použití standardní cely s tříelektrodovým zapojením a chlazeným karuselem (4 °C) pro vzorky. Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s povrchem kapky 0,4 mm² byla použita jako pracovní. Referenční elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl elektroda a jako pomocná elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku. Program GPES verze 4.9 dodaný Eco-Chemie byl použit pro ovládání celého systému. Acetátový pufr (0,2 M CH₃COOH + 0,2 M CH₃COONa) byl použit jako nosný elektrolyt. Měření se provádělo při pokojové teplotě. Vzorky byly před měřením pročištěny argonem (99,999%) nasyceným ve vodě po dobu 10 minut. Koncentrace kadmia byla měřena pomocí adsorpční rozpouštěcí diferenční pulsní voltametrie. Anodické skenování bylo inicializováno na -0,7 V a zastaveno na -0,4 V. Kadmi-

Tabulka 1. Analytické parametry HPLC-ED pro detekci redukovaného (GSH) a oxidovaného (GSSG) glutathionu a fytohelatinu2 (PC2)

Sloučeniny ¹	Retenční čas	Rovnice regrese	Lineární dynamický rozsah (µM)	Lineární dynamický rozsah (µg.ml ⁻¹)	R ^{2,2}	LOD ³ (nM)	LOD (ng.ml ⁻¹) na nástrík	LOD (fmol) na nástrík	LOQ ⁴ (nM)	LOQ (ng.ml ⁻¹)	LOQ (nmol) na nástrík	RSD ⁵ (%)
GSH	5,13	$y = 10,71x - 0,154$	0,159 - 325	0,0488 - 100	0,999	6	2	110	60	17	1	3,2
GSSG	9,26	$y = 1,187x - 0,106$	0,318 - 163	0,1950 - 100	0,999	26	16	510	260	160	5	4,8
PC2	10,66	$y = 2,028x - 0,021$	0,180 - 185	0,0970 - 100	0,999	17	9	340	170	90	3	4,3

1...studie thiolových sloučenin.

2...regresní koeficient.

3...limit detekce detektoru (3 S/N).

4... limit kvantifikace detektoru (10 S/N).

5...relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 2. Návratnost analýzy PC2 ze vzorku suspenzních tabákových BY-2 buněk (n = 5)

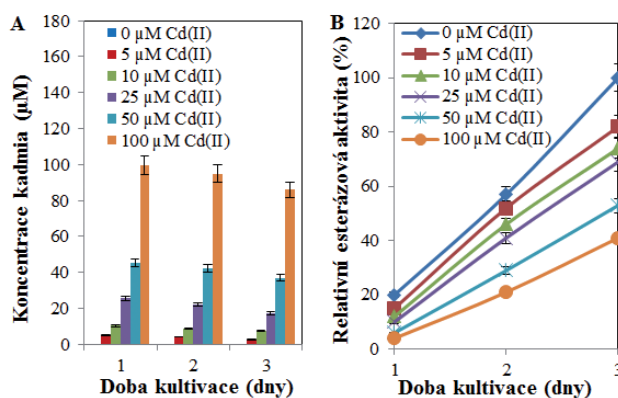
Sloučeniny	Standardní přidávek (ng.ml ⁻¹)	Buněčný extrakt (ng.ml ⁻¹)	Buněčný extrakt + standardní přidávek (ng.ml ⁻¹)	Návratnost (%)
PC2	500 ± 22	610 ± 26	1086 ± 47	98
	100 ± 4	610 ± 26	691 ± 30	97
	50 ± 2	610 ± 26	613 ± 26	93

Tabulka 3. Vnitro- a mezi-denní přesnost a správnost chromatografické metody

Sloučeniny	Přidávek (µg.ml ⁻¹)	Vnitro-denní (n=8) C.V. (%)	Návratnost (%)	Mezi-denní (n=3) C.V. (%)	Návratnost (%)
PC2	10	7,5	102	10,2	106
	50	6,2	105	8,9	104
	100	5,3	106	9,6	102

um bylo vylučováno na HMDE při potenciálu $-0,7$ V a dobou akumulace 120 s. Roztok byl během depozice míchán (1450 rpm). Ostatní parametry metody byly: modulační čas 0,02 s, časový interval 0,1 s, potenciálový krok 1,05 mV rychlost snímání $10,5$ mVs⁻¹, modulační amplituda 49,5 mV (Kryštofova, et al. 2010), (Klejduš, et al. 2004).

Pro analýzu kadmia byly použity buňky připravené dle kapitoly 2.1. Na obrázku (Obr. 7A) jsou porovnány získané výsledky analýz. Je zde patrné, že koncentrace kadmia v živné půdě, tak s dobou expozice.



Obrázek 7. (A) Vliv času kultivace buněk na celkový obsah kadmia, který byl v buňkách stanoven pomocí metody DPV (podle kapitoly 2.6). (B) Stanovená esterázová aktivita v průběhu třídenní kultivace (podle kapitoly 2.7).

2.7 Stanovení esterázové aktivity

Kultivační medium bylo z tabákových BY-2 buněk odstraněno centrifugací (360 g, 5 min, 20 °C, (Eppendorf 5804, USA). Buňky byly následně dvakrát promyty 50 mM fosfátovým pufrům (pH 8,7). 100 – 200 µg promytých buněk bylo smíšeno s extrakčním pufrům 250 mM fosforečnan draselný pH 8,7 na konečný objem 1 ml a byly homogenizovány pomocí homogenizátoru (Schuett-Biotec GmbH, Göttingen, Německo) po dobu 2 minut. Redoxní stav získaného roztoku se udržoval přidávkem 1 mM tris(2-karboxyetyl)fosfinu (TCEP). Homogenizované vzorky byly dále rozrušovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (Sonoplus mini 20, Bandelin, Německo) po dobu 2 minut. Homogenát byl centrifugován po dobu 15 min, 10 000 g, 4 °C (Eppendorf 5417R, USA). Alikvoty 5 µl supernatantu byly smíšeny s fosfáto-draseným pufrům o objemu 995 µl (1 M, pH 8,75). Reakce byla nastartována přidáním fluorescein diacetátu (FDA) o koncentraci 5 µM. Konečný objem reakční směsi byl 1 ml. Jako slepý vzorek byl použit extrakční pufr. Po inkubaci v termomixeru (Thermomixer comfort 1,5ml, Eppendorf, USA) po dobu 15 min, při 45 °C byly alikvoty reakční směsi (5 µl) přidány k fosfáto-drasenému pufrům (pH 8,7, 1995 µl). U vzorků byla změřena fluorescence (λexcitace 490 nm a λemise 514 nm). Zásobní roztok FDA byl připraven v acetonu. Množství acetonu v reakční směsi nebylo vyšší než 1 % (v/v). Esterázová aktivita v mezinárodních jednotkách (IU, 1 IU = jeden mikromol fluoresceinu uvolněný za minutu, při stanovených podmínkách) byla přepočítána na relativní jednotky (100 % představuje nejvyšší naměřenou aktivitu) (Viteček, et al. 2004; Viteček, et al. 2007).

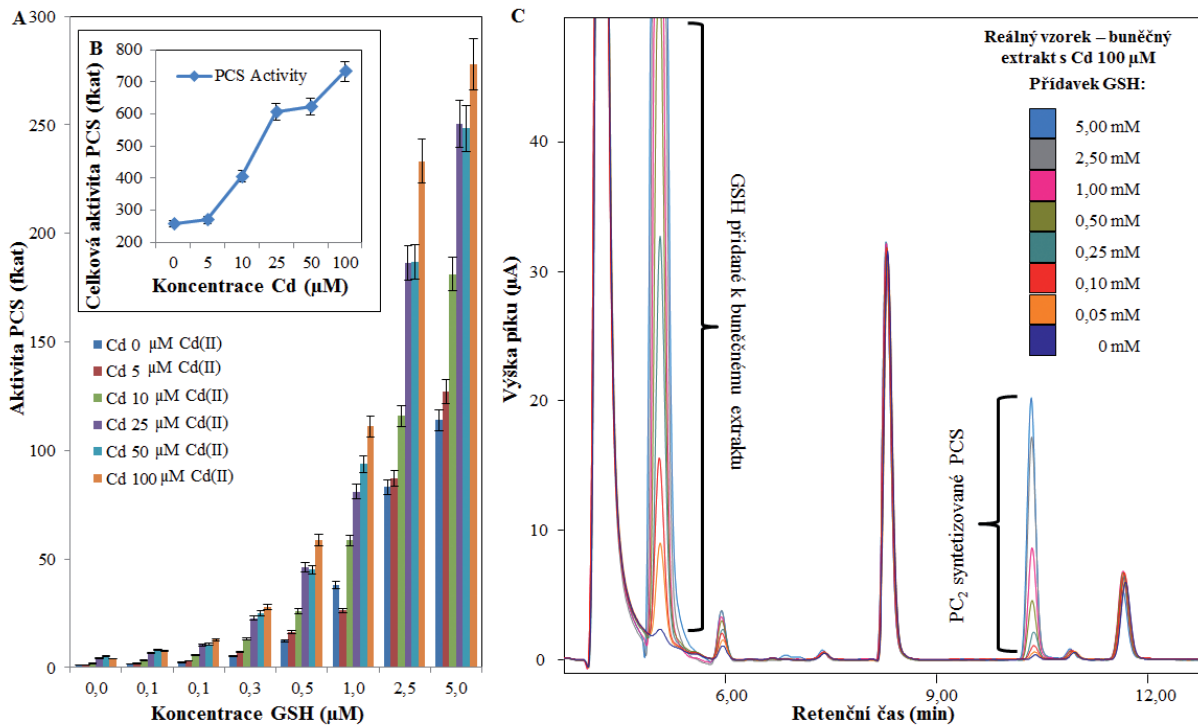
Pro stanovení esterázové aktivity byly použity buňky připravené dle kapitoly 2.1. Z výsledků vyplývá (Obr. 7B), že kadmium mělo nepříznivý vliv na růst buněk, který se zesiloval s dobou expozice. Se zvyšující se koncentrací kadmia v živné půdě, se zvyšoval i inhibiční efekt.

2.8 Vyhodnocení PCS

Aktivita PCS byla charakterizována rozdílem koncentrací PC2 kontrolního vzorku a vzorků z reakčních směsí s přidáním kovu. Tyto závislosti i s vlivem Cd(II) použitého při kultivaci buněk jsou znázorněny na (Obr. 8), i s příslušnými chromatografickými záznamy (Obr. 8C), které ukazují růst píku PC2 po přidání různých koncentrací substrátu (GSH) enzymové reakce u nejvyšší aplikované koncentrace Cd(II), která byla 100 µM. Výsledky byly přepočítány na fmol/s=fkat.

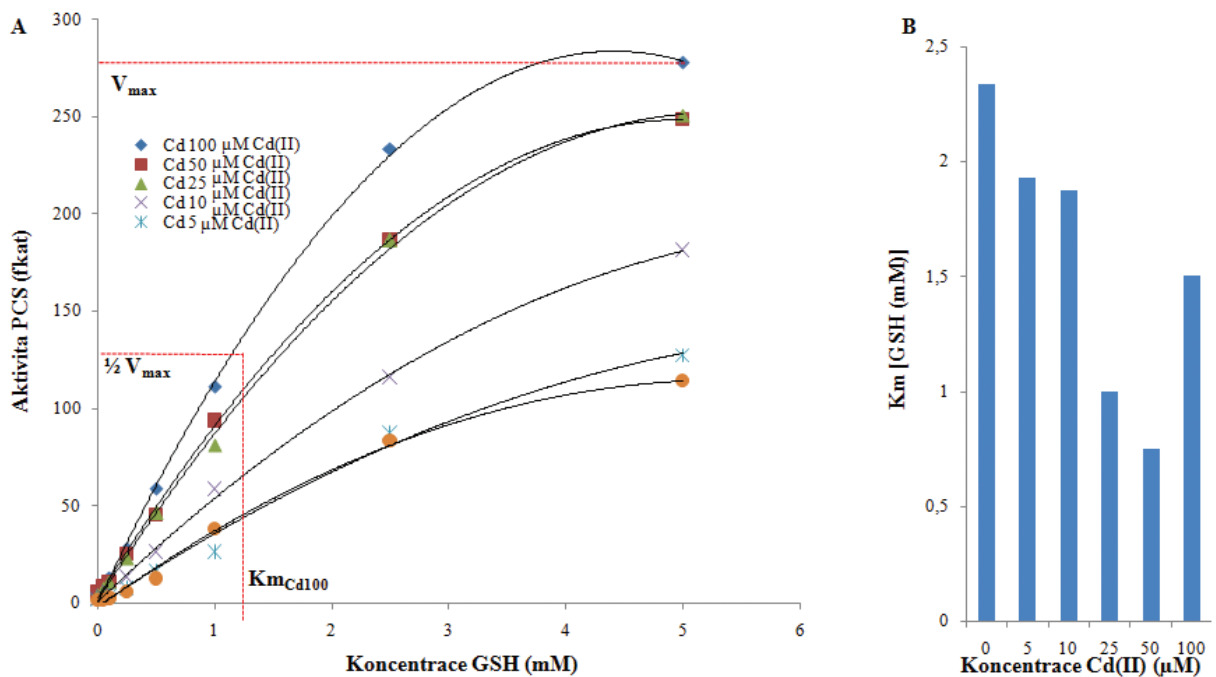
2.8.1 Linearizace (charakterizace kultury)

Díky použití různých koncentrací kovů u experimentálního modelu buněk a následně inkubací homogenátů při různých koncentracích substrátu bylo možno dosáhnout určení konstanty Michales-Mentenové (K_m), která charakterizuje maximální aktivitu enzymu PCS. Nejnižší určená K_m ukazuje při jaké koncentraci je syntéza PCs v rostlinných buňkách nejvyšší a rostlina je schopna odolávat. Charakterizace buněčné kultury z hlediska hodnot K_m pro jednotlivé aplikované koncentrace kovů byla zjištěna přidávkem substrátu enzymové reakce v koncentracích GSH (0 – 5 mM). Tuto závislost znázorňuje (Obr. 9A). Dále byly provedeny výpočty převrácené hodnoty tvorby PC2 ($1/v$) a převrácená hodnota koncentrace substrátu ($1/S$), které jsou potřebné pro provedení linearizace dle Lineweaver-Burka a následný výpočet K_m z rovnice Michaelis-Mentenové. Z hodnot K_m v závislosti na aplikované koncentraci Cd(II) byl sestaven graf (Obr. 9B), který vyjadřuje schopnost kultury odolávat působení těžkého kovu.



Obrázek 8. (nahore) (A) Porovnání vlivu obsahu použité Cd(II) a koncentrace substrátu enzymové reakce (GSH). (B) Vliv použité koncentrace Cd(II) na PCS aktivitu. (C) Proložení chromatogramů získaných pro homogenáty buněk BY-2 ovlivněných nejvyšší aplikovanou koncentrací Cd(II) (100 μg/ml) s různými přídavky GSH (0 – 5 mM), jako substrátu enzymové reakce.

Obrázek 9. (dole) (A) Vliv aplikované koncentrace substrátu enzymové reakce na aktivitu PCS. (B) Zhodnocení schopnosti kultury odolávat těžkým kovům. Vyjádřeno pomocí konstanty Michaelis-Mentenové.



III. Aplikace na reálné vzorky

Pro aplikaci této metodiky lze použít jakýkoli rostlinný materiál, u něhož má stanovení fytochelatinsyntázové aktivity potenciál.

Pro znázornění možnosti aplikace této metodiky lze uvést vzorky kukuřice, jež byly vystaveny expozici těžkého kovu, konkrétně PtCl_4 o koncentraci 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM .

3.1 Příprava rostlin

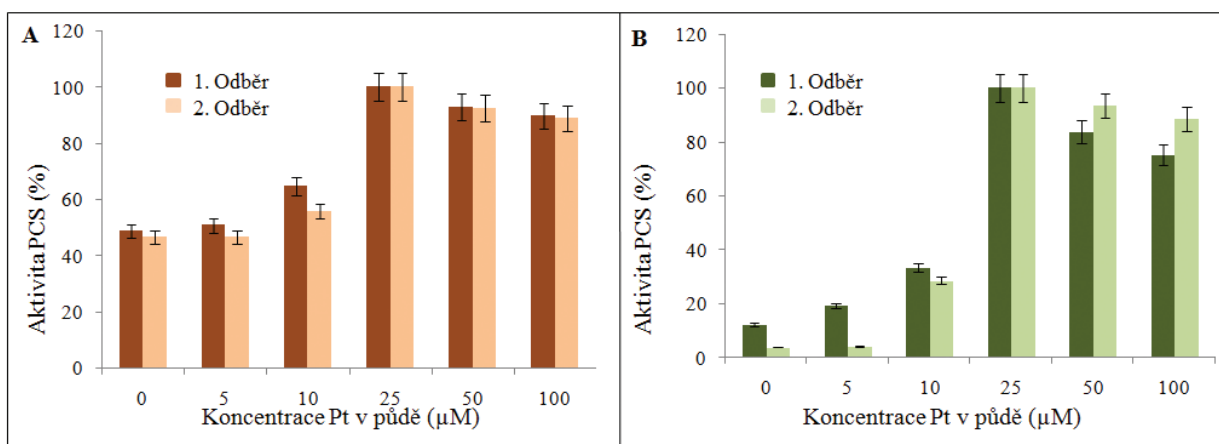
Kukuřičná zrna byla aplikována na Richterův živný roztok a nechána ve tmě po dobu 5 dnů, z důvodu naklíčení. Naklíčené rostlinky byly vsazeny do hydroponických košíčků a v živném médiu za nastaveného světelného režimu byly dále ponechány v kultivačním boxu. V živném médiu byly obsaženy i aplikované koncentrace PtCl_4 0, 5, 10, 25, 50 a 100 μM . V 8. a 12. dnu kultivace proběhly odběry kultivovaných rostlin. Tyto rostliny byly rozděleny na kořeny a nadzemní části a následně zamrazeny, pro uchování k analýzám.

3.2 Příprava vzorku pro analýzu PCS

Bylo naváženo 0,050 g vzorků kukuřice z kořenů i z nadzemních částí, ty byly rozdrceny v třecí misce za působení tekutého dusíku a následně homogenizovány s 250 μl 20 mM fosfátového pufru (pH 7,5) a 1mM tris(2-karboxyetyl)fosfinu (TCEP) 2 minut. Homogenáty byly centrifugovány (16 400 g, 20 min, 4 °C) (Eppendorf 5417R, USA). Vzniklé supernatanty od každého vzorku byly rozděleny na dva díly (kontrola a reakční směs). Kontroly byly smíchány v objemu 50 μl supernatantu s 50 μl směsi 20 mM fosfátového pufru s 1 mM TCEP (pH 7,5). Reakční směsi byly smíchány tak, že k 50 μl supernatantu bylo přidáno 50 μl směsi 5mM GSH v prostředí 20 mM fosfátového pufru s 1 mM TCEP (pH 7,5) a posléze bylo přidáno ještě 0,5 μl CdCl_2 (10 mM). Všechny takto připravené kontroly i reakční směsi, vždy v celkovém objemu 100 μl , byly 30 minut inkubovány v termomixu při teplotě 35 °C a 300 rpm (Thermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf, USA). Následovalo přidání 2 μl 5 mM 5-sulfosalicylové kyseliny, pomocí které došlo k zastavení enzymové reakce. Po přepipetování roztoků do jednotlivých vialek, které byly následně naskládány do autosampleru s chlazením na 8 °C, bylo přistoupeno k analýze na HPLC-ED. Množství PC2 nasyntetizované během inkubace odpovídá aktivitě enzymu. Vzorky byly po celou dobu (mimo dobu inkubace) udržovány na ledu.

3.3 Výsledky

Aktivita PCS byla charakterizována rozdílem koncentrací PC2 kontrolního vzorku a vzorků s reakční směsí a aktivačním kovem. Na (Obr. 10) je uvedena stanovená aktivita fytochelatinsyntázy jak pro kořeny, tak pro nadzemní části v obou provedených odběrech. Je zde patrné, že námi použité rostliny kukuřice dosahují nejvyšší aktivity fytochelatinsyntázy při koncentraci platiny v půdě 25 μM . Po této hranici se začíná tato aktivita snižovat, ale při použitých koncentracích nedochází k úplné záhubě rostlin a to jak v nadzemní, tak ani v kořenové části.



Obrázek 10. Změna aktivity fytochelatinsyntázy ve vzorcích kukuřice pěstované v půdě s různými koncentracemi platiny (A) kořeny (B) nadzemní části.

IV. Srovnání novosti postupů

Metodika přináší nové postupy v souladu s §2 odst. 1 písm. a) bod 2 zákona č. 130/2002 Sb. Popsaného metodického postupu bylo dosaženo systematickou tvůrčí prací v základním i aplikovaném výzkumu, kterými byly experimentální a teoretické práce prováděné s cílem získání nových poznatků zaměřených na budoucí využití v praxi. Využití metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí dosud v souvislosti se studiem aktivity enzymu PCS nebylo aplikováno.

V. Popis uplatnění metodiky

Navržená metodika stanovení aktivity fytochelatinsyntázy je určena pro hodnocení rezistence rostlinných buněk vůči těžkým kovům. Uplatnění je možné jak ve výzkumu zaměřeném na vlastnosti rostlin, tak při obdobně zaměřeném genovém inženýrství.

Fytoremediace

Metodiku lze uplatnit při hodnocení odolnosti rostlin vůči těžkým kovům. Toho lze využít při vysazování kulturních plodin v oblastech, které jsou prokazatelně zatížené kontaminací těžkými kovy pro technologie známé jako fyto-remediace.

Hodnocení vhodné genetické modifikace rostlin

Metodu lze využít při hodnocení geneticky modifikovaných rostlin zamýšlených pro fyto-remediace. Zde je důležité zhodnotit, zda a kolik těžkého kovu je rostlina schopna do sebe v daném zamořeném prostředí ještě akumulovat. S tím souvisí jak určení maximální efektivní koncentrace, tak určení vlivu prostředí a sledování změn ostatních fyziologických parametrů.

Dostupnost a uplatnění

Metoda má potenciální uplatnění zejména pro vývojové laboratoře, které se zabývají výzkumem stresu odolných rostlin a pro laboratoře zabývající se genetickými modifikacemi. Z pohledu instrumentální náročnosti takovýchto laboratoří je tato metoda středně dostupná.

VI. Ekonomické aspekty

Rostliny mohou být pěstovány kvůli různým ekonomickým důvodům zahrnující nutriční, energetické, konstrukční či jiné technologické účely. Díky bioremediacím se do popředí dostávají i ekologické důvody. Díky těmto technologiím lze využít rostliny k odstraňování xenobiotik z prostředí. Proto jsou hledány další postupy, pomocí kterých by bylo možno hodnotit vlastnosti rostlin z hlediska odolnosti vůči samotným xenobiotikům. Zavedení metodiky přispěje k možnostem hodnocení odolnosti rostlin vůči těžkým kovům, což má význam nejenom pro rozvoj zemědělství v regionech, které se potýkají s nadměrným přírodním či antropogenně generovaným výskytem těžkých kovů v půdách, ale i pro účely šlechtění nových druhů odolných rostlin. Zavedení postupů popsanych v metodice je možné v rámci spotřebního materiálu vyčíslit sumou 40 000 Kč. Uplatnění výsledků umožní zvýšit efektivitu odstraňování kovů z kontaminovaných půd, a tím snížit ekonomickou nákladnost těchto technologií. Náklady na konvenční likvidaci zamořené půdy mohou být velmi vysoké – v řádu milionů: od bagrování zeminy a odvozu na skládku (cca 1 ha do hloubky 20 cm/900tis Kč) do speciální úpravy (náklady na recyklaci 200 m³ zeminy jsou neznámé) a pak návratu zeminy zpět na místo (závisí na vzdálenosti) či nahrazováním transportem z jiných lokalit. Oproti tomu remediální technologie, které zahrnují výsadbu a sklizeň rostlin, a transport usušených rostlin do spalovny, dosáhnou podobného efektu byt za delší dobu, která je dána vegetačním cyklem, nicméně se zlomkovými náklady v řádech desetitisíců Kč. Dále pak tyto výsledky mohou přispět i ke zvýšení účinnosti cílené těžby některých vzácných kovů pomocí rostlin ve spojení s dalšími speciálními technologiemi extrahování kovů z rostlin.

VII. Seznam použité související literatury

Anjum, Naser A., et al.

2012 Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review. *Environmental and Experimental Botany* 75(0):307-324.

Babula, P., et al.

2008 Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6(4):189-213.

Bramanti, E., et al.

2006 Determination and characterization of phytochelatin by liquid chromatography coupled with on line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 1133(1-2):195-203.

Cazale, A. C., and S. Clemens

2001 *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *Febs Letters* 507(2):215-219.

Clemens, S., B. Naumann, and M. Hippler

2009 Proteomics of metal mediated protein dynamics in plants - iron and cadmium in the focus. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 14:1955-1969.

Cobbett, C., and P. Goldsbrough

2002 Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53:159-182.

Cobbett, C. S.

—1999 A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends in Plant Science* 4(9):335-337.

—2000a Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* 3(3):211-216.

—2000b Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123(3):825-832.

Deng, Q., et al.

2003 Microscale determination of purines in tissue samples by capillary liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst* 128(8):1013-1018.

di Toppi, L. S., and R. Gabbriellini

1999 Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41(2):105-130.

Diopan, V., et al.

2010 Determination of Plant Thiols by Liquid Chromatography Coupled with Coulometric and Amperometric Detection in Lettuce Treated by Lead(II) Ions. *Electroanalysis* 22(11):1248-1259.

Dixon, D. P., et al.

1998 Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1(3):258-266.

Dubreuil-Maurizi, C., et al.

2011 Glutathione Deficiency of the *Arabidopsis* Mutant pad2-1 Affects Oxidative Stress-Related Events, Defense Gene Expression, and the Hypersensitive Response. *Plant Physiology* 157(4):2000-2012.

Elviri, L., et al.

2010 Identification of in vivo nitrosylated phytochelatin in *Arabidopsis thaliana* cells by liquid chromatography-direct electrospray-linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(25):4120-4126.

Fanguy, J. C., and C. S. Henry

2002 Pulsed amperometric detection of carbohydrates on an electrophoretic microchip. *Analyst* 127(8):1021-1023.

Foyer, C. H., et al.

1997 Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100(2):241-254.

Foyer, C. H., and G. Noctor

2011 Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155(1):2-18.

Foyer, C. H., F. L. Theodoulou, and S. Delrot

2001 The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* 6(10):486-492.

Grill, E., E. L. Winnacker, and M. H. Zenk

1985 Phytochelatin - the principal heavy-metal complexing peptides of higher-plants. *Science* 230(4726):674-676.

Hasan, S. A., et al.

2009 Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* 30(2):165-174.

Howden, R., and C. S. Cobbett

1992 Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 100(1):100-107.

Howden, R., et al.

1995 Cadmium-sensitive, CAD1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiology* 107(4):1059-1066.

Klejdus, B., et al.

2004 Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to cadmium. *Analytica Chimica Acta* 520(1-2):117-124.

Krystofova, O., et al.

2010 Electrochemical Microsensors for the Detection of Cadmium(II) and Lead(II) Ions in Plants. *Sensors* 10(6):5308-5328.

Lawrence, N. S., et al.

2002 Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Analytical Biochemistry* 303(1):1-16.

Lee, S., et al.

2003 Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology* 131(2):656-663.

Liu, Yun-Jun, et al.

2012 Gene families of maize glutathione-ascorbate redox cycle respond differently to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* 169(2):183-192.

May, M. J., et al.

1998 Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49(321):649-667.

Minami, T., S. Ichida, and K. Kubo

2002 Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 781(1-2):303-311.

Minocha, R., et al.

2008 Separation and quantification of monothiols and phytochelatin from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1207(1-2):72-83.

Nagata, T., Y. Nemoto, and S. Hasezawa

1992 Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher-plants. *Int. Rev. Cytol.* 132:1-30.

Najmanova, J., et al.

2012 Cadmium-induced production of phytochelatin and speciation of intracellular cadmium in organs of *Linum usitatissimum* seedlings. *Industrial Crops and Products* 36(1):536-542.

Ohkama-Ohtsu, N., K. Fukuyama, and D. J. Oliver

2009 Roles of gamma-Glutamyl Transpeptidase and gamma-Glutamyl Cyclotransferase in Glutathione and Glutathione-Conjugate Metabolism in Plants. In *Advances in Botanical Research: Oxidative Stress and Redox Regulation in Plants*, Vol 52. J.P. Jacquot, ed. Pp. 87-+. *Advances in Botanical Research*. London: Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd.

Ortiz, D. F., et al.

1992 Heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an atp-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *Embo Journal* 11(10):3491-3499.

Ortiz, D. F., et al.

1995 transport of metal-binding peptides by hmt1, a fission yeast abc-type vacuolar membrane-protein. *Journal of Biological Chemistry* 270(9):4721-4728.

Padmavathamma, P. K., and L. Y. Li

2007 Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution* 184(1-4):105-126.

Pal, R., and J. P. N. Rai

2010 Phytochelatin: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(3):945-963.

Petrlova, J., et al.

2006 Simultaneous determination of eight biologically active thiol compounds using gradient elution-liquid chromatography with Coul-Array detection. *Journal of Separation Science* 29(8):1166-1173.

Potesil, D., et al.

2005 Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays* L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* 1084(1-2):134-144.

Rai, P. K.

2008 Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: An ecosustainable approach. *International Journal of Phytoremediation* 10(2):133-160.

Ranieri, A., et al.

2005 Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(1):45-54.

Sadi, B. B. M., et al.

2008 An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatin in genetically modified *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 861(1):123-129.

Seth, C. S., et al.

2012 Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant Cell and Environment* 35(2):334-346.

Shah, K., and J. M. Nongkynrih

2007 Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51(4):618-634.

Shestivska, V., et al.

2010 Metallothionein and low molecular thiol compounds determination in transgenic tobacco exposed to CdCl₂. *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 126(11):403-403.

Supalkova, V., et al.

2007 Electroanalysis of plant thiols. *Sensors* 7(6):932-959.

Szalai, G., et al.

2009 Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 28(1):66-80.

Trojanowicz, M., M. Szewczynska, and M. Wcislo

2003 Electroanalytical flow measurements - Recent advances. *Electroanalysis* 15(5-6):347-365.

Vandenberg, P. J., and D. C. Johnson

1993 Pulsed electrochemical detection of cysteine, cystine, methionine, and glutathione at gold electrodes following their separation by liquid-chromatography. *Analytical Chemistry* 65(20):2713-2718.

Vatamaniuk, O. K., et al.

2001 A new pathway for heavy metal detoxification in animals - Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 276(24):20817-20820.

Vignaud, C., et al.

2004 Separation and identification by gel filtration and high-performance liquid chromatography with UV or electrochemical detection of the disulphides produced from cysteine and glutathione oxidation. *Journal of Chromatography A* 1031(1-2):125-133.

Vitecek, J., et al.

2004 Esterases as a marker for the growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the norway spruce. *Plant. Cell. Tiss. Org.* 79(2):195-201.

Vitecek, J., et al.

2007 A fluorimetric sensor for detection of one living cell. *Sensors* 7(3):222-238.

Yadav, S. K.

2010 Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* 76(2):167-179.

Zehnalek, J., V. Adam, and R. Kizek

2004a Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 120(7-8):222-224.

Zehnalek, J., J. Vacek, and R. Kizek

2004b Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals. *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 120(7-8):220-221.

Zenk, M. H.

1996 Heavy metal detoxification in higher plants - A review. *Gene* 179(1):21-30.

Zitka, O., et al.

2010a High performance liquid chromatographic assay for detection of phytochelatin-synthase. *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 126(11):418-419.

Zitka, O., et al.

2011a Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *Journal of Hazardous Materials* 192(2):794-800.

Zitka, O., et al.

2010b Detection of phytochelatin in flax (*Linum usitatissimum* L). *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 126(11):423-423.

Zitka, O., et al.

2011b Rapid and Ultrasensitive Method for Determination of Phytochelatin(2) using High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *International Journal of Electrochemical Science* 6(5):1367-1381.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Diopan, V., et al.

2010 Determination of Plant Thiols by Liquid Chromatography Coupled with Coulometric and Amperometric Detection in Lettuce Treated by Lead(II) Ions. *Electroanalysis* 22(11):1248-1259.

Zitka, O., et al.

2011a Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *Journal of Hazardous Materials* 192(2):794-800.

Zitka, O., et al.

2012 Electrochemistry of copper(II) induced complexes in mycorrhizal maize plant tissues. *Journal of Hazardous Materials* 203:257-263.

Zitka, O., et al.

2010 Detection of phytochelatin in flax (*Linum usitatissimum* L). *Listy Cukrovarnicke a Reparske* 126(11):423-423.

Zitka, O., et al.

2011b Rapid and Ultrasensitive Method for Determination of Phytochelatin(2) using High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *International Journal of Electrochemical Science* 6(5):1367-1381.

IX. Dedikace a poděkování

Tato publikace vznikla z výsledků řešení grantu QJ1310100 „Vývoj a optimalizace metod stanovení biogenních aminů v návaznosti na zvýšení zdravotní bezpečnosti siláží“ financovaného národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV) a výsledků infrastrukturního projektu CZ.1.05/1.1.00/02.0068 CEITEC - Středoevropský technologický institut, centrum excelentní vědy“ uděleného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. A také za podpory „Lead and Cadmium Initiatives, United Nations Environment Programme“.



POZNÁMKY:

POZNÁMKY:



POZNÁMKY:

Název titulu: **Metodika stanovení fytochelatinsyntázy pro hodnocení stresu těžkými kovy**

Autoři: Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D. ^{1,4,5}, Bc. et Bc. Markéta Komínková⁵,
Mgr. Olga Kryštofová¹, Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D. ^{1,4},
Doc. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D.², Dr. Ing. Zdeněk Havlíček³,
Doc. Ing. Josef Zehnálek, CSc. ^{1,4}, MSc. Miguel Angel Merlos Rodrigo^{1,4},
Prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc. ^{4,5}, Prof. Ing. René Kizek, Ph.D.^{1,4}

Adresy: ¹Ústav chemie a biochemie, ²Ústav výživy zvířat a pícninářství, ³Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, CZ-613 00 Brno, Česká republika
⁴Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 3058/10, CZ-613 00 Brno, Česká republika
⁵Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1-3, CZ-612 42 Brno, Česká republika

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně

Jazyková korektura: Ing. Pavlína Šobrová, Bc. et Bc. Markéta Komínková

Grafická úprava : Mgr. Michal Horák

Vydání: první, 2013

Počet stran: 21

Náklad: 300 ks

ISBN: 978-80-7375-700-7