

Navržení metody pro hodnocení rostlinných hyperakumulátorů těžkých kovů



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně

**Ondřej Zítka, Natalia Cernei, Petr Majzlík,
René Kizek**

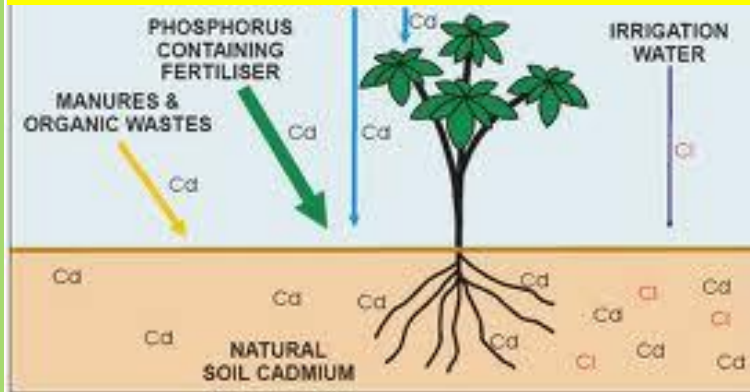
*Ústav chemie a biochemie, telefon: 545 133 350,
e-mail: zitkao@seznam.cz*



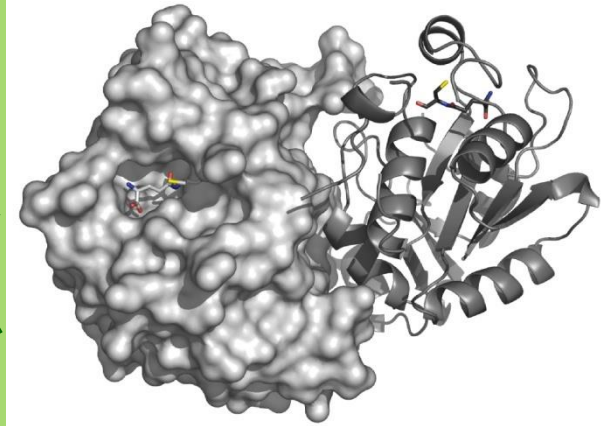
Biologické funkce fytochelatin syntézy (PCS)

2

Zdroje kadmia a jeho příjem rostlinou z prostředí



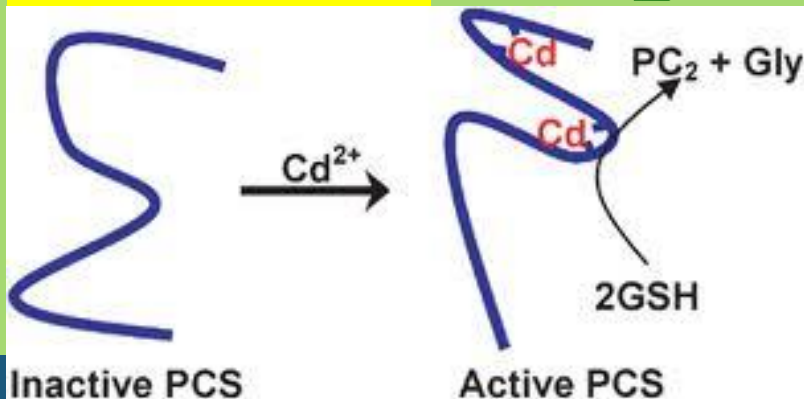
Cd ionty indukují syntézu PCS



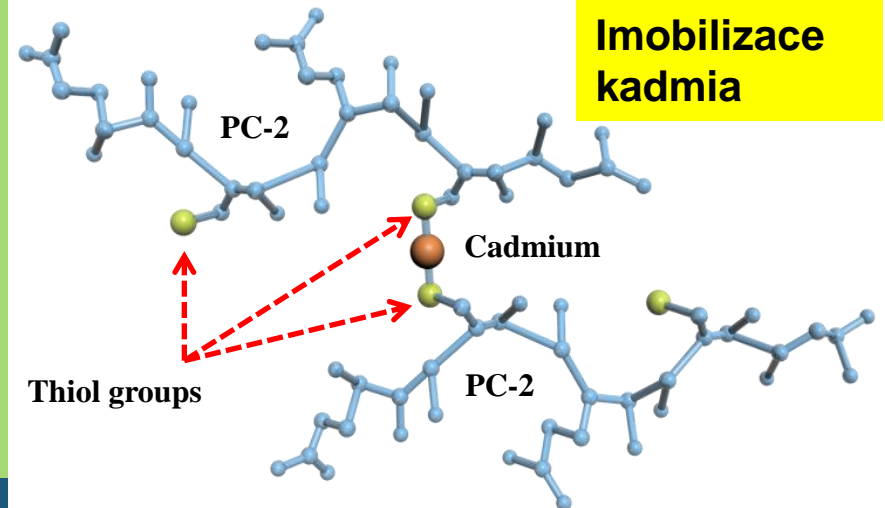
Struktura PCS

PCS je aktivována Cd ionty

Aktivace PCS

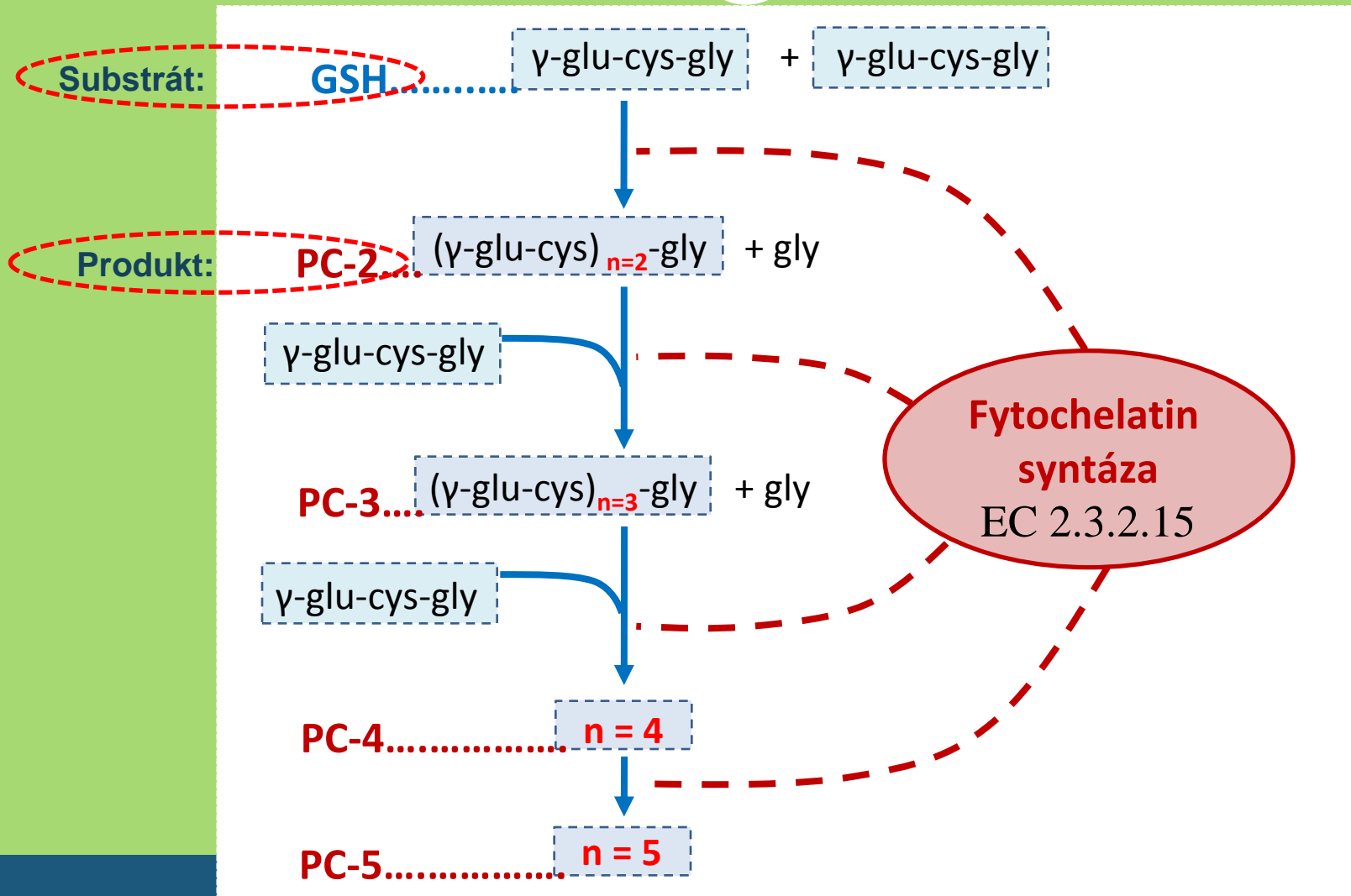


Imobilizace kadmia

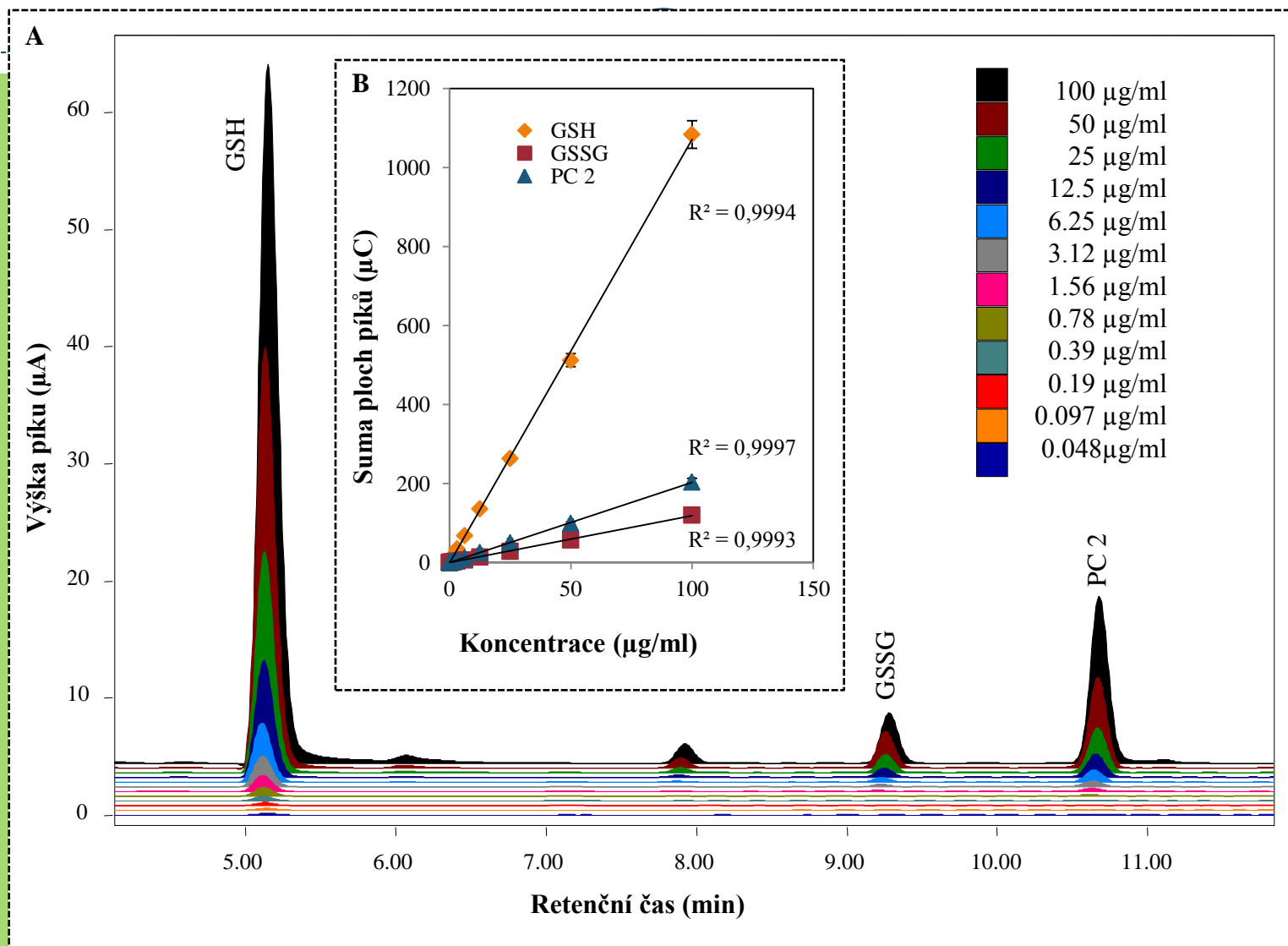


Syntéza fytochelatinů prostřednictvím PCS

3



Optimalizace separace GSH, GSSG a PC-2



Limity detekce: GSH 2 ng.ml⁻¹, GSSG 16 ng.ml⁻¹ a PC-2 9 ng.ml⁻¹

Kultivace BY-2 buněk v přítomnosti kadmennatých iontů

5

Kultivace BY-2 buněk s přidavkem různých koncentrací Cd(II) iontů během třídní kultivace v tekutém médiu Murashige and Skoog.

0 μM



5 μM



10 μM



25 μM



50 μM



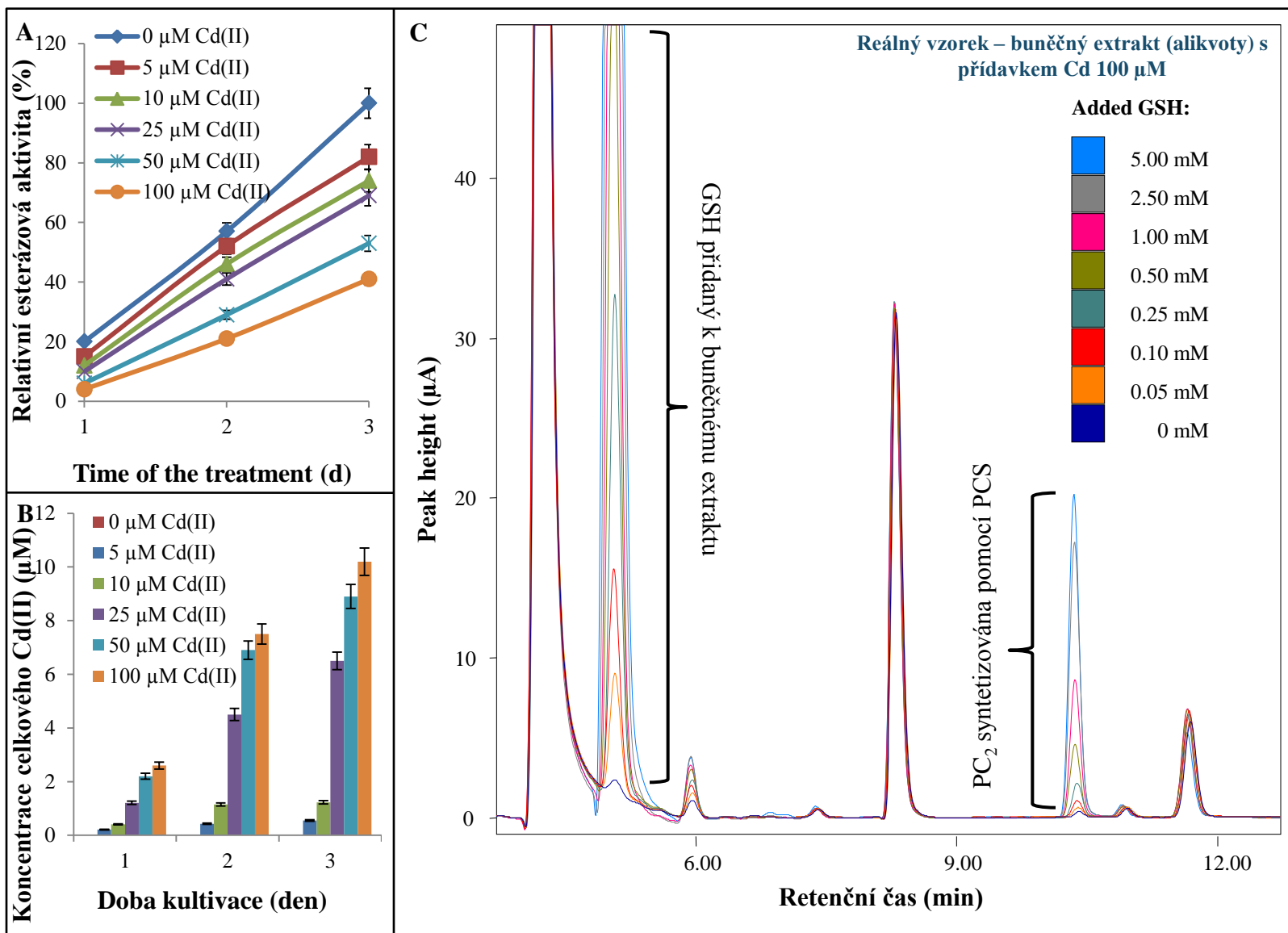
100 μM Cd(II)



Následně Byla analyzováno:

- **A, Životnost buněk** – analyzována pomocí esterázové aktivity
- **B, Celkový obsah Cd(II) v BY-2 buňkách** – analyzováno pomocí metody diferenční pulzní voltametrie
- **C, Obsah PC-2 jako produkt PCS** – analyzováno pomocí vyvinuté metody HPLC-ED

Analýza BY-2 buněk kultivovaných s kadmnatými ionty



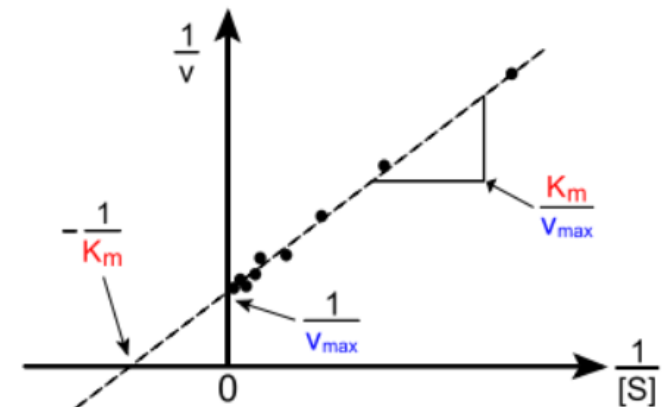
Stanovení aktivity PCS

7

- Ze získaných koncentrací PC-2 produkovaných PCS z BY-2 buněčných extraktů jsme zjišťovali změny v kinetice Michalis-Mentenové v závislosti na aplikované koncentraci Cd(II).
- Hodnoty K_m charakterizují aktivitu PCS stejně jako koncentraci samotného aktivního enzymu v buněčném extraktu.
- Data byla linearizována dle Lineweaver-Burka a odtud byla určena hodnota K_m .

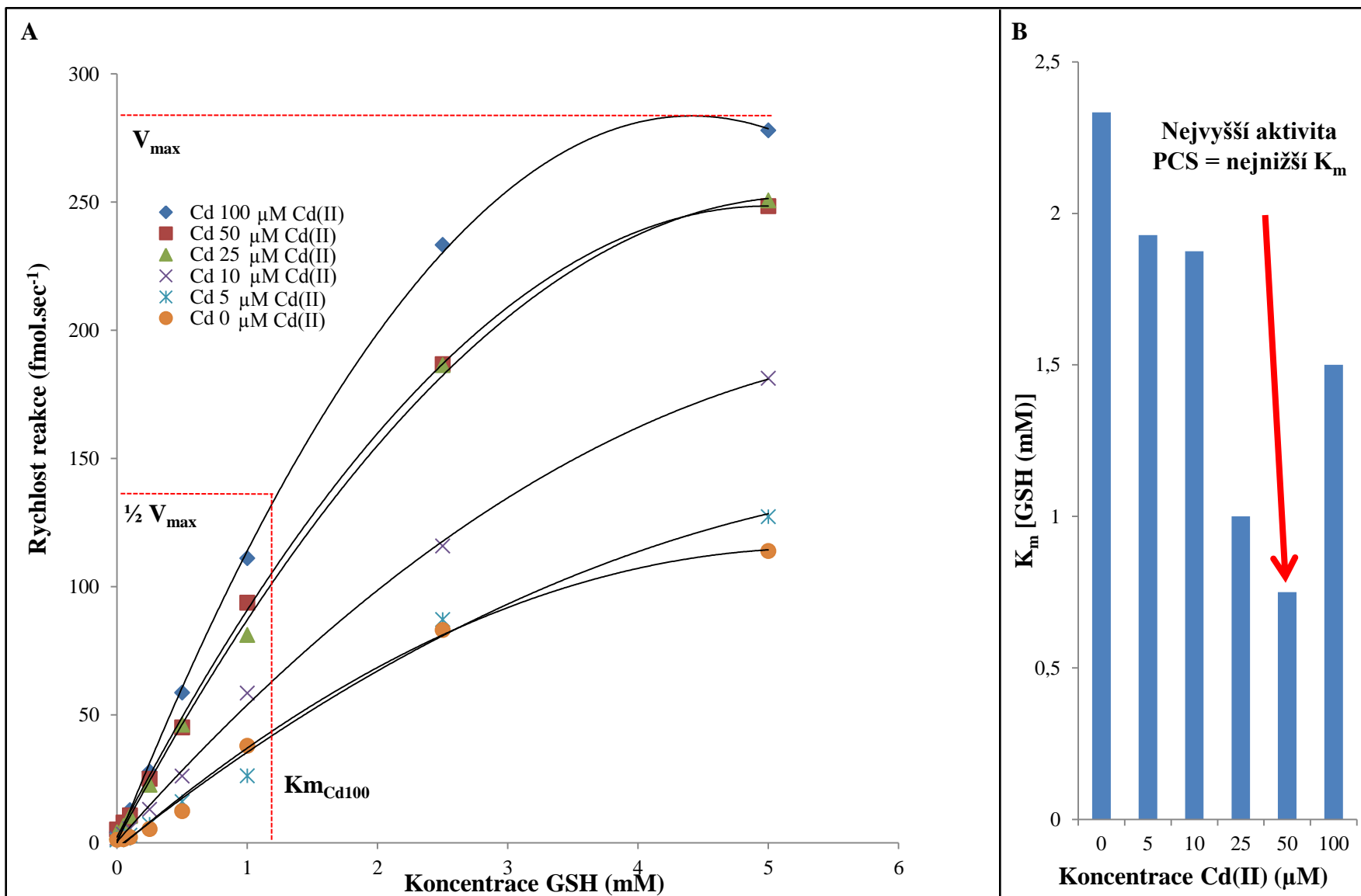
$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Rovnice Michaelis-Mentenové



Linearizace dle
Lineweaver-Burka

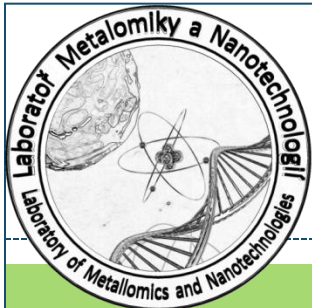
Stanovení aktivity PCS v buněčný extraktech



Shrnutí

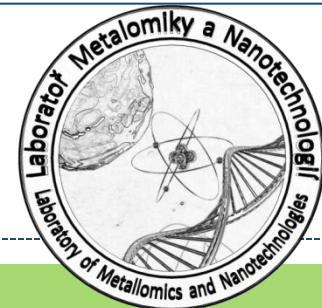
9

- **Podařilo se nám vyvinout metodu HPLC-ED pro stanovení aktivity PCS**
- **Optimalizovaný postup byl využit pro stanovení aktivity PCS v buněčných extraktech tabáku linie BY-2 kultivovaných v přítomnosti Cd(II) iontů**
- **Nejvyšší aktivita PCS byla stanovena v buňkách BY-2, které byly kultivovány v přítomnosti 50 μ M koncentrace Cd(II) iontů**
- **Tato metoda může být velmi slibným nástrojem pro hodnocení odolnosti rostlin vůči těžkým kovům**

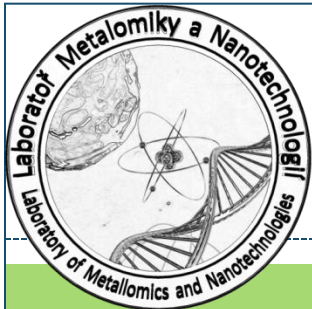


Publikace - články

10



- Výsledky získané v průběhu řešení projektu se staly podkladem pro přípravu dvou publikací, které byly publikovány v mezinárodních ISI indexovaných časopisech:
- Zitka, O., et al.: **Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution.** *Journal of Hazardous Materials*, 192, 2011, s. 494-800. **IF 3.723**
- Zitka, O., et al.: **Rapid and Ultrasensitive Method for Determination of Phytochelatin₂ using High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection.** *Journal of electrochemical science*, 6, 2011, s. 1367-1381. **IF 2.808**



Publikace - konference

11



- Zitka, O., et al.: **Employment of HPLC with coulometric detection for analysis of phytochelatin synthase activity.** Setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků 2011. ISBN 978-80-7375-514-0
- Zitka, O., et al.: **A NOVEL METHOD FOR ANALYSIS OF PLANTS' RESISTANCE TO HEAVY METALS.** MendelNet 2011. Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic.
- Zitka, O., et al.: **MONITORING OF PHYTOCHELATIN SYNTHASE ACTIVITY IN PRESENCE OF CADMIUM(II) IONS.** Toxcon 2011. Praha, Czech Republic, ISSN: 1337-9569 (elektronická verze).

Poděkování

12

- Všem spolupracovníkům z Laboratoře Metalomiky a Nanotechnologií vedené Doc. Rene Kizekem
- Práce byla podpořena projekty OPVK
 - Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148
 - Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



Děkuji vám za vaši pozornost

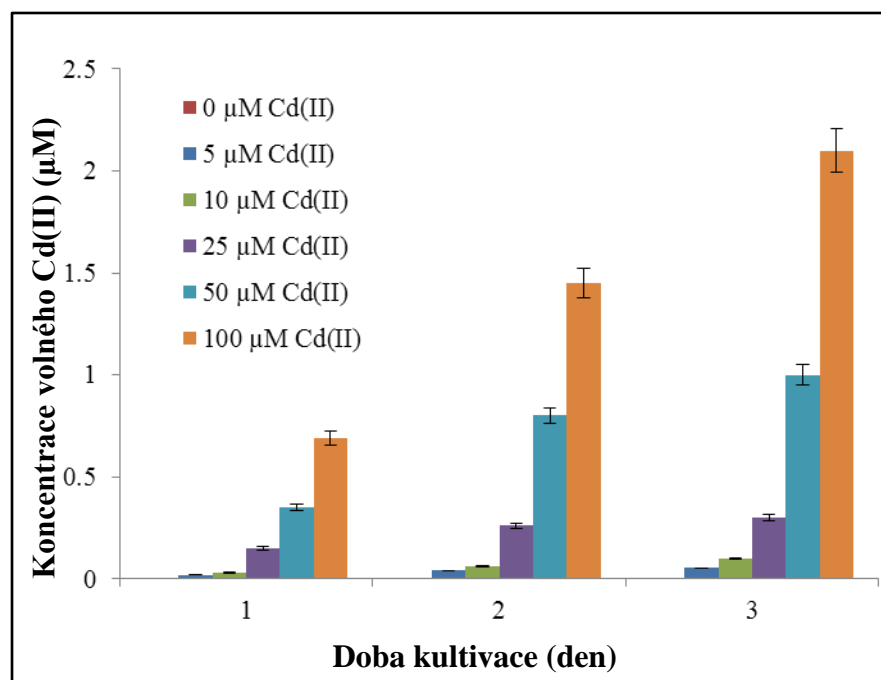


Dotazy:

14

- Dotaz: V cíli práce je uvedeno stanovení volného a vázaného kovu, zde však toto stanovení není specifikováno.
- Odpověď: V závěrečné zprávě je na grafu uvedeno pouze stanovení vázaného kadmia jako absolutní koncentrace Cd(II) iontů které bylo prokazatelně do buněk naakumulováno. Při stanovení volného kadmia v buňkách byly zjištěn obdobný vzestupný trend avšak v koncentracích které byly vždy cca o 70-90% nižší než byla koncentrace vázaného kovu (viz. následující slide).

Analýza volného kadmia v buňkách

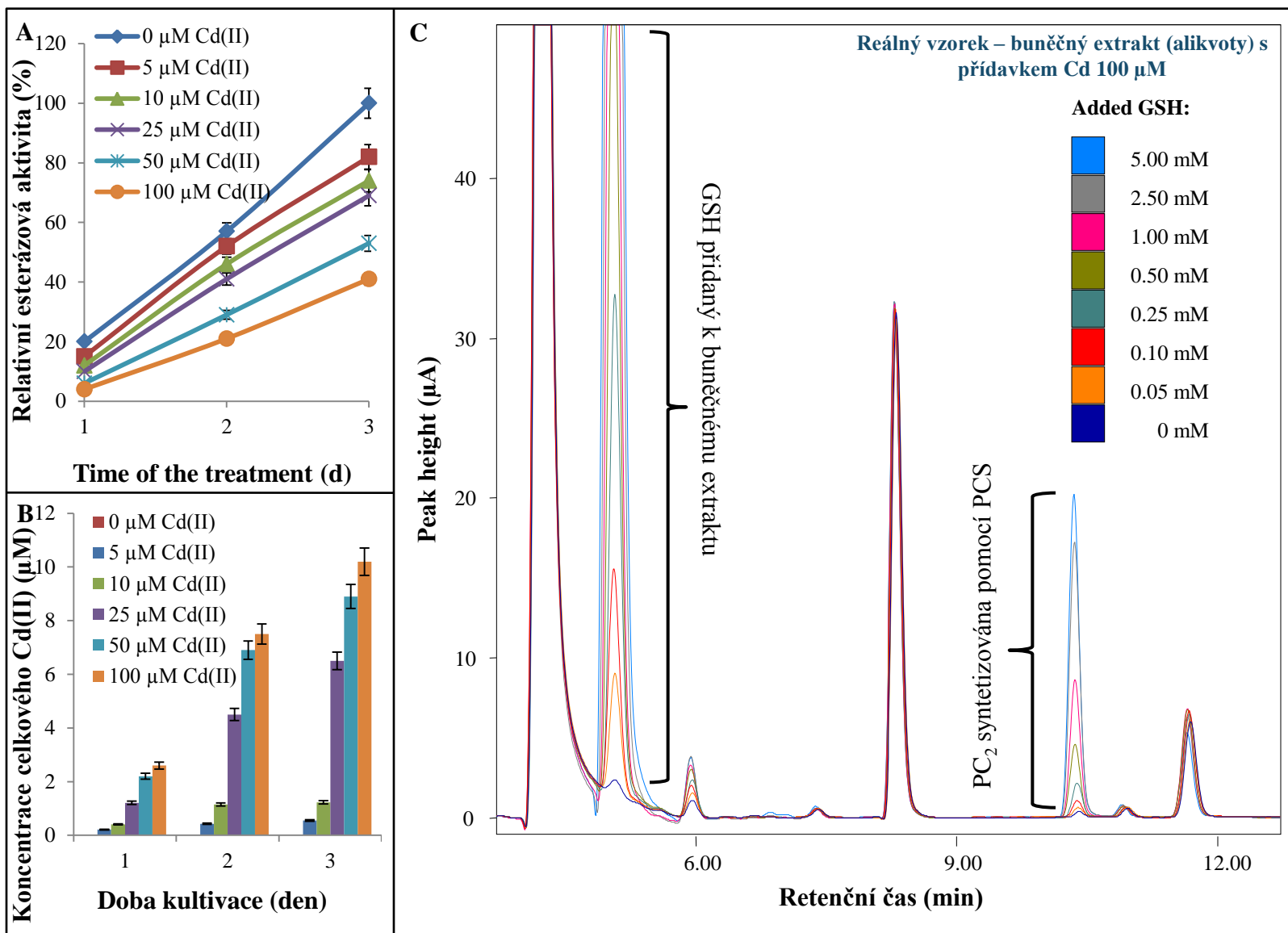


Dotazy oponenta:

16

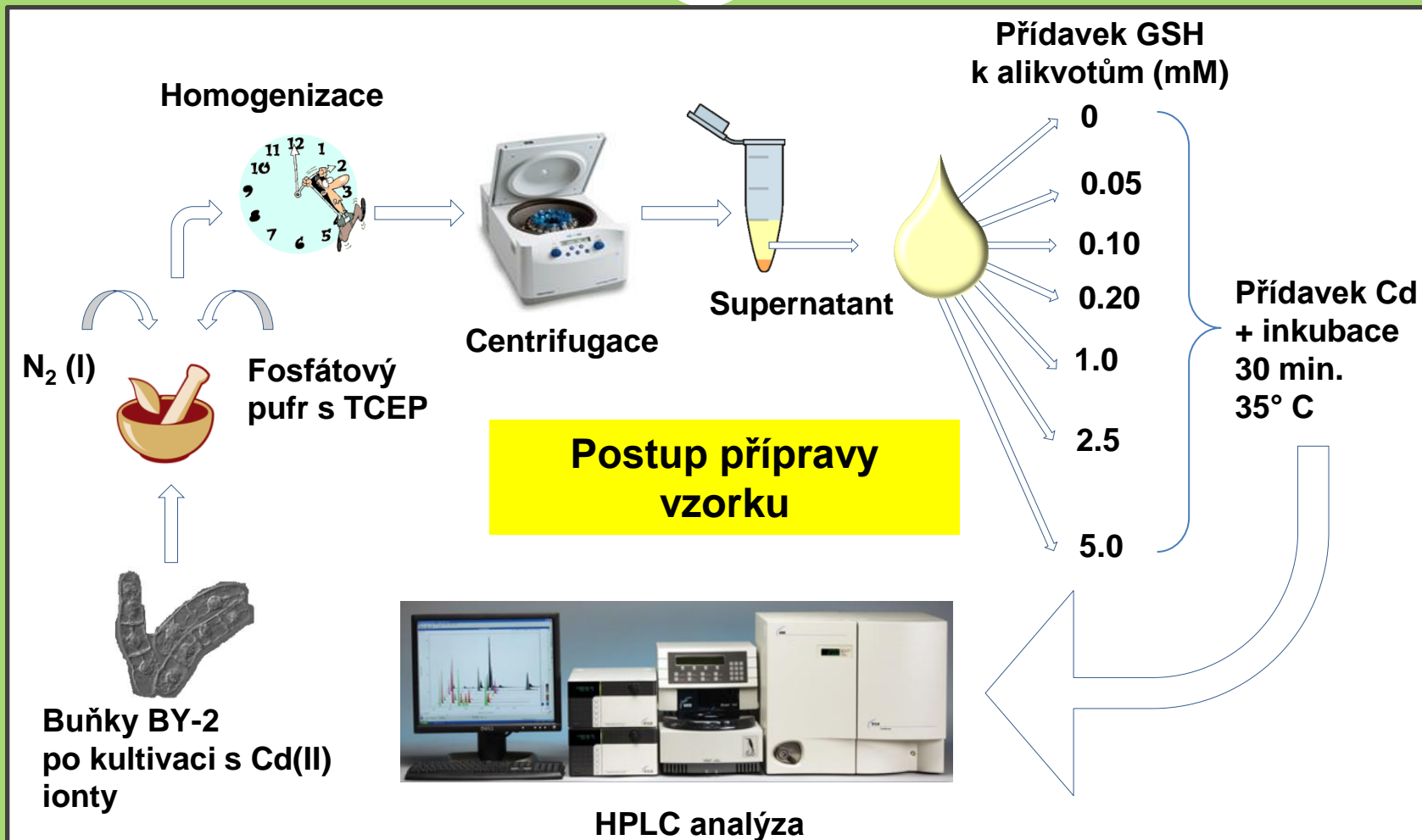
- Dotaz: Zde mám technickou připomínku: Pokud je použit pro prezentaci přehledný graf, pak není nutné uvádět hodnoty v textu. Graf ale postrádá srozumitelnost, pokud obsahuje více variant a není barevně odlišen.
- Odpověď: Hodnoty uvedené na obrázku nejsou hodnotami K_m uvedenými v textu nýbrž hodnotami koncentrace přídavku GSH. Hodnoty směrnice jsou podkladem pro výpočet aktivity PSC vztažené na každou z aplikovaných koncentrací Cd(II) a proto jsou uvedeny v textu. Na následujícím slidu je patřičný obrázek uveden v barvách.

Analýza BY-2 buněk kultivovaných s kadmnatými ionty



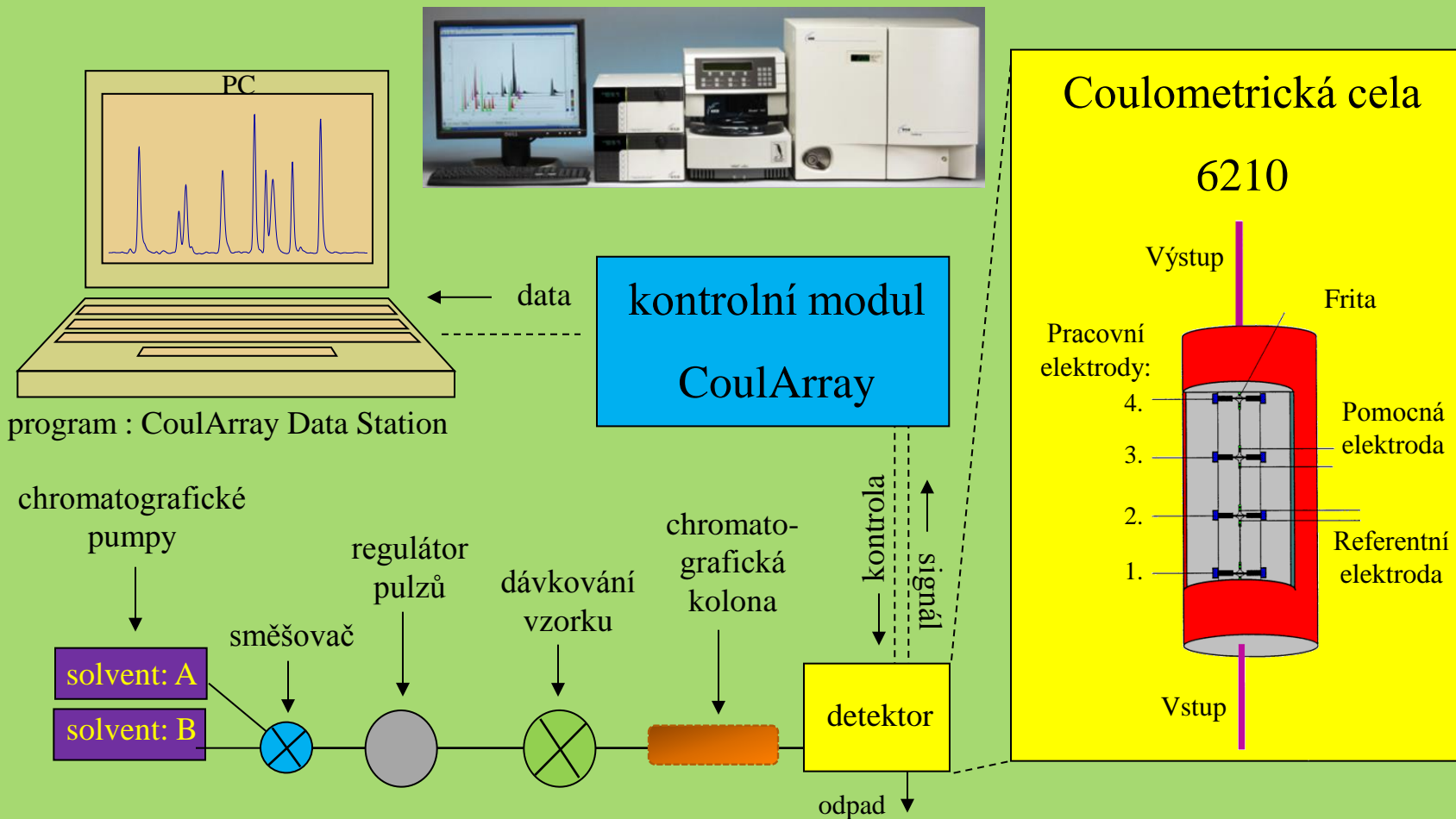
Příprava vzorku buněk BY-2 pro analýzu PCS

19



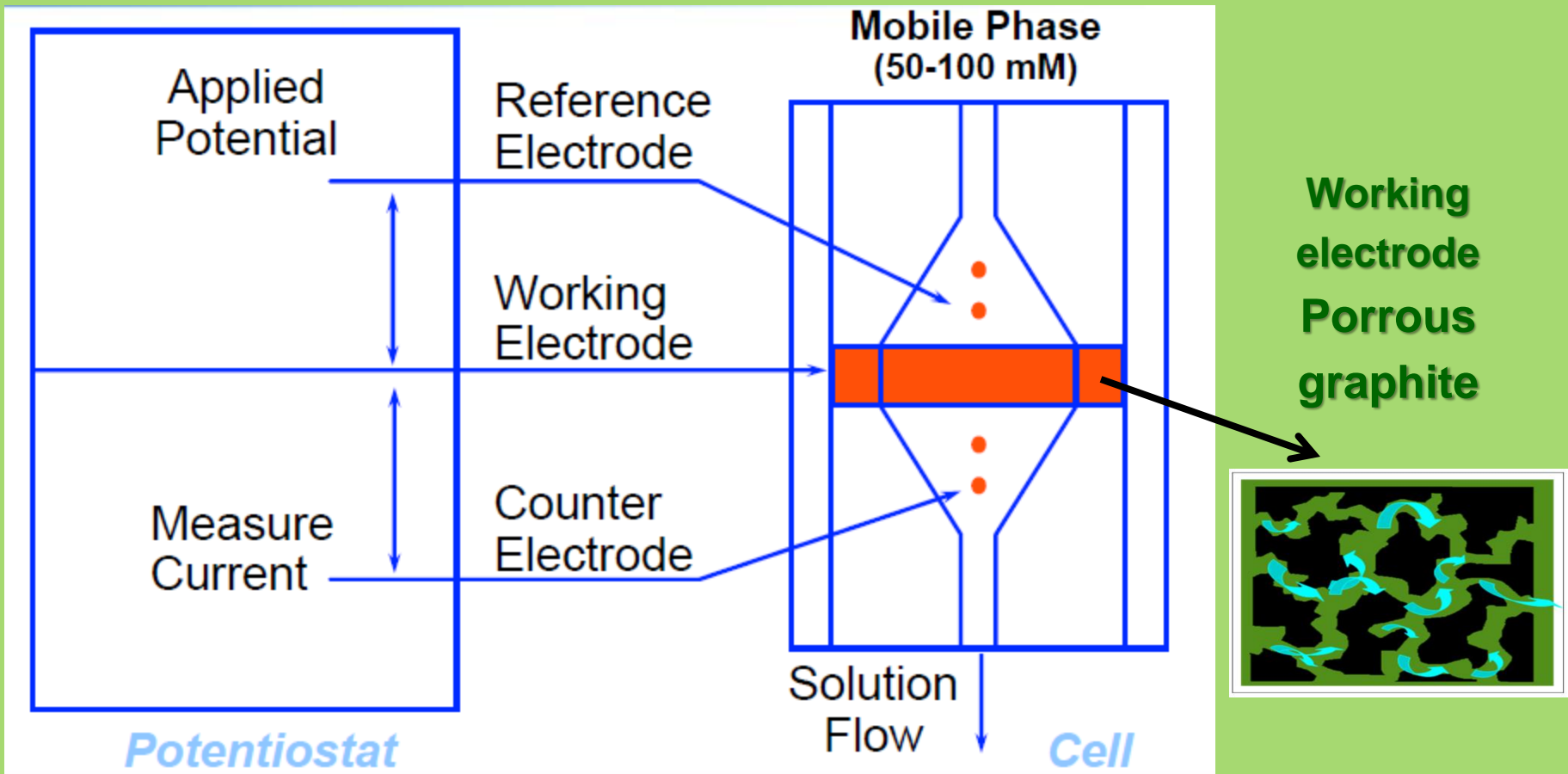
Schema přístroje HPLC-ED (CoulArray)

20



Coulometric detection – scheme of the electrochemical detector

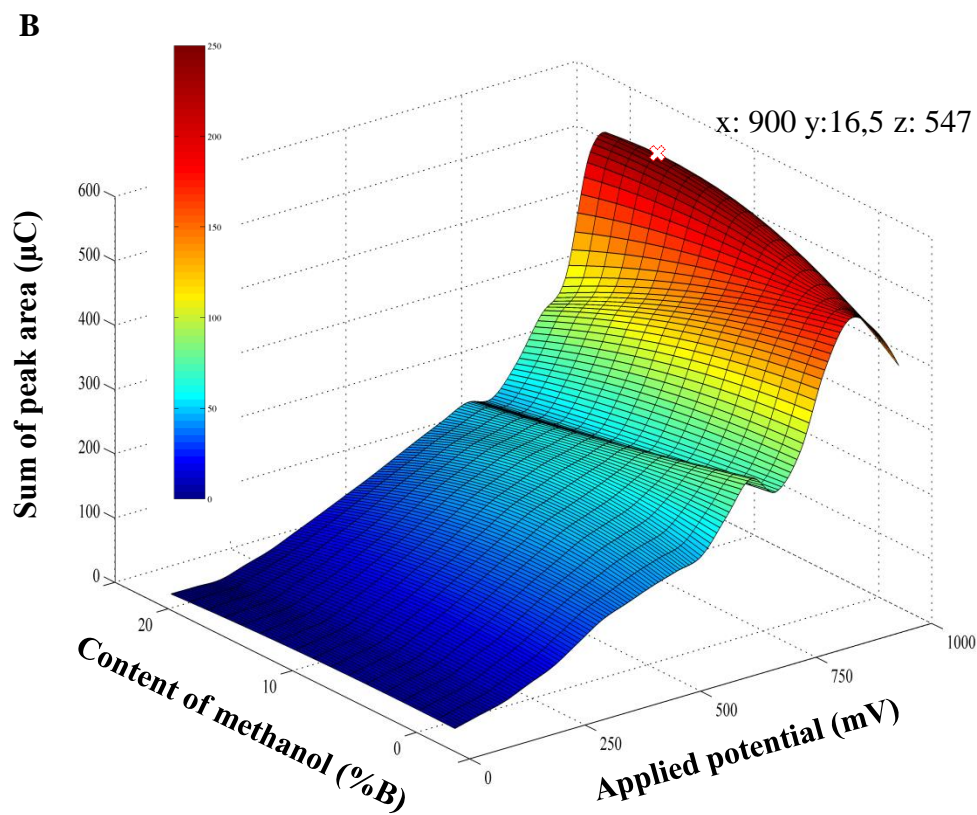
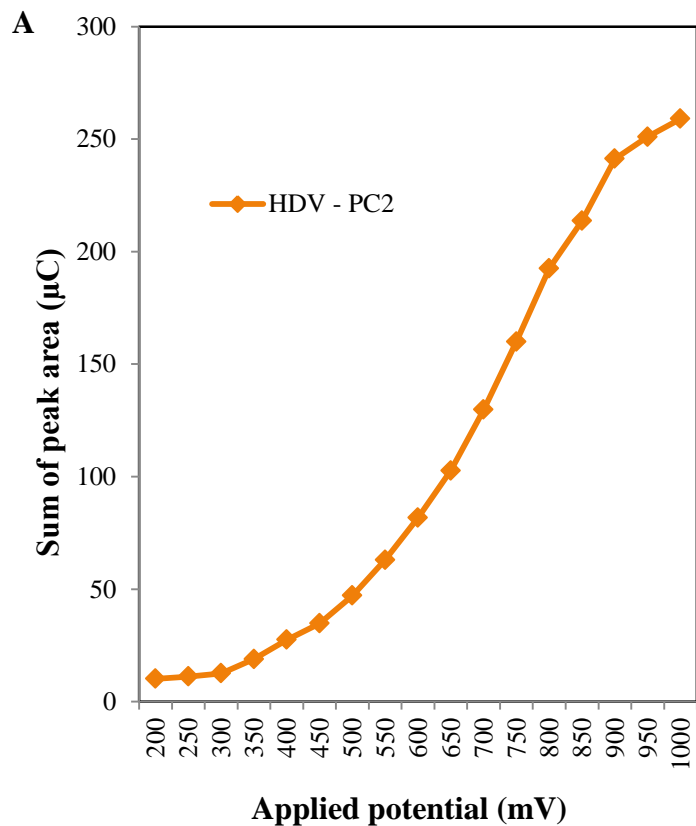
21



More than 95 % of passing-through compounds are detected

Optimization of Detection of PC-2

22



HDV = Hydrodynamic Voltammogram