

APLIKACE SPEKTROFLUORIMETRICKÉHO STANOVENÍ ESTERAS V ROSTLINNÉM MATERIÁLU

JAN VÍTEČEK^a, VOJTĚCH ADAM^b,
JIŘÍ PETŘEK^a, PETR BABULA^c, PAVLA
NOVOTNÁ^d, RENÉ KIZEK^b a LADISLAV HAVEL^a

^aÚstav biologie rostlin, ^bÚstav chemie a biochemie, MZLU Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^cÚstav přírodních léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3 612 42 Brno, ^dÚstav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 56a, 621 00 Brno
vitecek@mendelu.cz

Došlo 19.3.04, přepracováno 2.11.04, přijato 10.3.05.

Klíčová slova: bakterie, buněčná suspenze, cibule kuchyňská, esterasy, smrk ztepilý, spektrofotometrie, tabák

Úvod

Esterasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících krátké uhlíkaté řetězce¹. V rostlinných buňkách a pletivech se účastní mnoha biochemických dějů, např. výstavby buněčné stěny², degradace některých xenobiotik^{3,4} a signálních procesů⁵. Na rozdíl od mikrobiálních¹ nejsou rostlinné esterasy používány jako biokatalyzátory v organické syntéze. Nicméně z výše uvedeného vyplývá, že představují značný potenciál pro rostlinné biotechnologie^{6–10}. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterasy jako ukazatel životaschopnosti^{11–13}. Kromě toho některé práce upozornily na fakt, že aktivita intracelulárních esterů buněčné suspenze je přímo úměrná počtu živých buněk^{13–15}. Cílem této práce bylo využít intracelulární esterasy jako ukazatele hustoty živých buněk v několika experimentálních systémech a využít získaná data pro konstrukci růstové křivky.

Experimentální část

Chemikálie a přístroje

Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie dodané firmou Lachema Neratovice (ČR) v čistotě p.a. Fosfátové puify byly připraveny z hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu draselného. Jejich pH bylo upraveno pomocí KOH. Fluoresceindiacetát (FDA) byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA). Používán byl jeho roztok v bezvodém acetonu. Na kultivační media byly použity chemikálie dodané firmou Duchefa Bioche-

mie BV (Nizozemí). Media a roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušných látek v deionizované vodě (18,2 MW, Iwa 20, Watek, ČR).

Veškeré centrifugace byly provedeny na centrifuze MR 22 (Jouan, USA). Fluorescence byla měřena fluorimetrem RF-551 (Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA).

Biologický materiál

Buněčná suspenze BY-2

Buněčná suspenze tabáku (*Nicotiana tabacum*) linie BY-2 byla udržována v tekutém mediu podle Murashiga a Skooga¹⁶ modifikovaném podle Nagaty¹⁷. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce (Kühner Shaker LT-W, Adolf Kühner AG, Švýcarsko) při 27 ± 1 °C a 135 ot min^{-1} ve tmě. Subkultivace probíhala dvakrát týdně. Pro experimenty byla použita kultura založená z 1 ml inokula.

Raná somatická embrya (ESE) smrku ztepilého klon 2/32

ESE smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) byla kultivována na polotuhém mediu¹⁸ modifikovaném podle autorů¹⁹. Kolonie složené z mnoha ESE byly umístěny na povrchu media ve 100 mm široké Petriho misce. Kultura byla udržována ve tmě při teplotě 23 ± 2 °C. Subkultivace byla prováděna po dvou týdnech. Pro účely experimentů byla kultura sledována během jednoho týdne od založení. Růst kultury ESE byl sledován počítačovou analýzou obrazu¹². Počet ESE ve vzorku byl zjišťován na základě empirické korelace: 1 mg biomasy odpovídá 15 ESE (cit.¹²).

Suspenzní kultura cibule

Kalus cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) byl odvozen na VFU v Brně z báze cibule na mediu podle Murashiga a Skooga modifikovaném (medium I) 30 g l^{-1} sacharosy, $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, 1 mg l^{-1} kyseliny 2-naftylacetové a 1 g l^{-1} gelritu (náhražka agaru). Dále byl udržován na mediu podle Murashiga a Skooga modifikovaném (medium II) 30 g l^{-1} sacharosy, $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové a 1 g l^{-1} gelritu. Subkultivace probíhala jednou za měsíc. Suspenzní kultura byla připravena roztřepáním výše uvedeného kalusu v kapalném mediu II (bez gelritu). Pro experimenty byla použita kultura založená přenesením 5 ml roztřepaného kalusu do 15 ml čerstvého media II.

Bakteriální kultury

Kultury bakterií *Escherichia coli* CCM 3954, *Staphylococcus aureus* CCM 2022 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 byly udržovány na šikmých masopeptonových agaroch při 37 °C ve tmě. Z agaru byly přeneseny do 20 ml kapalného media (16 g l^{-1} trypton, 10 g l^{-1} kvasničný extrakt a 5 g l^{-1} chlorid sodný). Po 24 h kultivace ve tmě na třepačce při 37 °C a 100 ot min^{-1} byl založen experiment přenesením 100 ml inokula do 20 ml čerstvého media. Kapalně kultury byly charakterizovány prostřednictvím absorbance při 600 nm (OD_{600}) (cit.^{20,21}).

Test životaschopnosti a stanovení hustoty suspenze

Vzorek kultury doplněný čerstvým médiem na objem 50 ml byl inkubován 5 min při pokojové teplotě s FDA ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a PI ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)²². Zastoupení živých (zeleně zbarvených) a mrtvých (červeně zbarvených) buněk bylo vyhodnoceno fluorescenčním mikroskopem (Olympus AX 70) vybaveným pro širokopásmovou UV excitaci (systav filtrů U-MWU). Hustota suspenze (počet buněk na ml suspenze) BY-2 byla stanovena mikroskopicky přímým počítáním ve Fuchsově-Rosenthalově komůrce.

Stanovení aktivity intracelulárních esterás

Kultura cibule (1 ml) a kultura tabáku (0,2 ml) byla sklizena 10 min centrifugací při 360 g a 20 °C. Shluky ESE byly odebrány z tuhého media. Suspenze bakterií (1 ml) byla sklizena centrifugací při 2000 g a 20 °C. Získaná biomasa byla dvakrát promyta extrakčním pufrům (250 mM fosfát, pH 8,7). Veškerá biomasa byla uchovávána při -20 °C. Vzorky byly po rozmrazení doplněny na celkový objem 1 ml (0,2 ml u cibule) extrakčním pufrům a desintegrovány ve skleněném pístovém homogenizátoru (Kavalier, ČR) uloženém v ledové lázni po dobu 10 min. K bakteriální biomase bylo přidáno 100 μl extrakčního pufru a cca 1/5 celkového objemu skleněného prachu (velikost částic 25 μm , Ultrasonic). Směs byla po 20 min intenzivně promíchávána na třepačce (1400 ot min^{-1}) při 4 °C a pak byla umístěna v ledu do ultrazvukové lázně na dobu 20 min. Získané rostlinné a bakteriální homogenáty byly centrifugovány (10 000 g, 15 min, 4 °C). Alikvot čirého extraktu byl přidán do reakční směsi obsahující fosfátový pufr (250 mM, pH 8,7) a 5 mM FDA, jehož zásobní roztok v bezvodém acetonu byl uchováván v uzavřených nádobkách při -20 °C. Množství acetonu v reakční směsi nepřekročilo 1 % (v/v). Po 15minutové inkubaci v termostatu při 35 °C byla změřena fluorescence – excitace 490 nm / emise 514 nm.

Aktivita esterás v IU (jedna mezinárodní jednotka

uvolní za výše uvedených podmínek 1 μmol fluoresceinu za minutu) byla přepočítána na relativní hodnoty, kdy 100 % představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu.

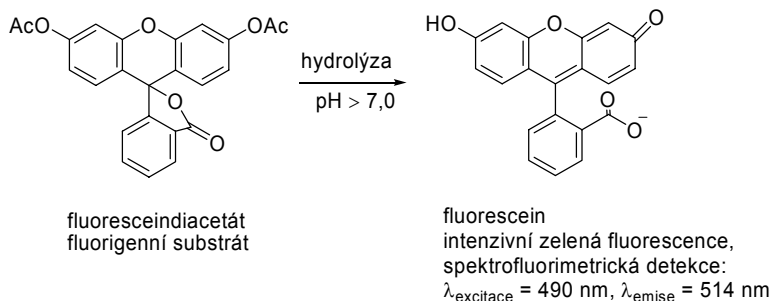
Výsledky a diskuse

Esterasy jsou enzymy vykazující nízkou substrátovou specifitu¹. V tabulce I jsou uvedeny vybrané substráty běžně využívané pro detekci esterás. V naší práci jsme jako substrát zvolili fluorescein-diacetát (FDA)^{23,24}. Fluorescein, který z FDA vzniká působením esterás (obr. 1), byl detegován spektrofotometricky. Excitační i emisní pás fluoresceinu leží ve viditelné oblasti světla (λ_{ex} 490 nm a λ_{em} 514 nm), takže bylo možné provádět detekci v běžně dostupných plastových kyvetách. Jistou nevýhodou představuje značná rychlost samovolné hydrolyzy FDA při $\text{pH} > 9,0$ (data neuvedena).

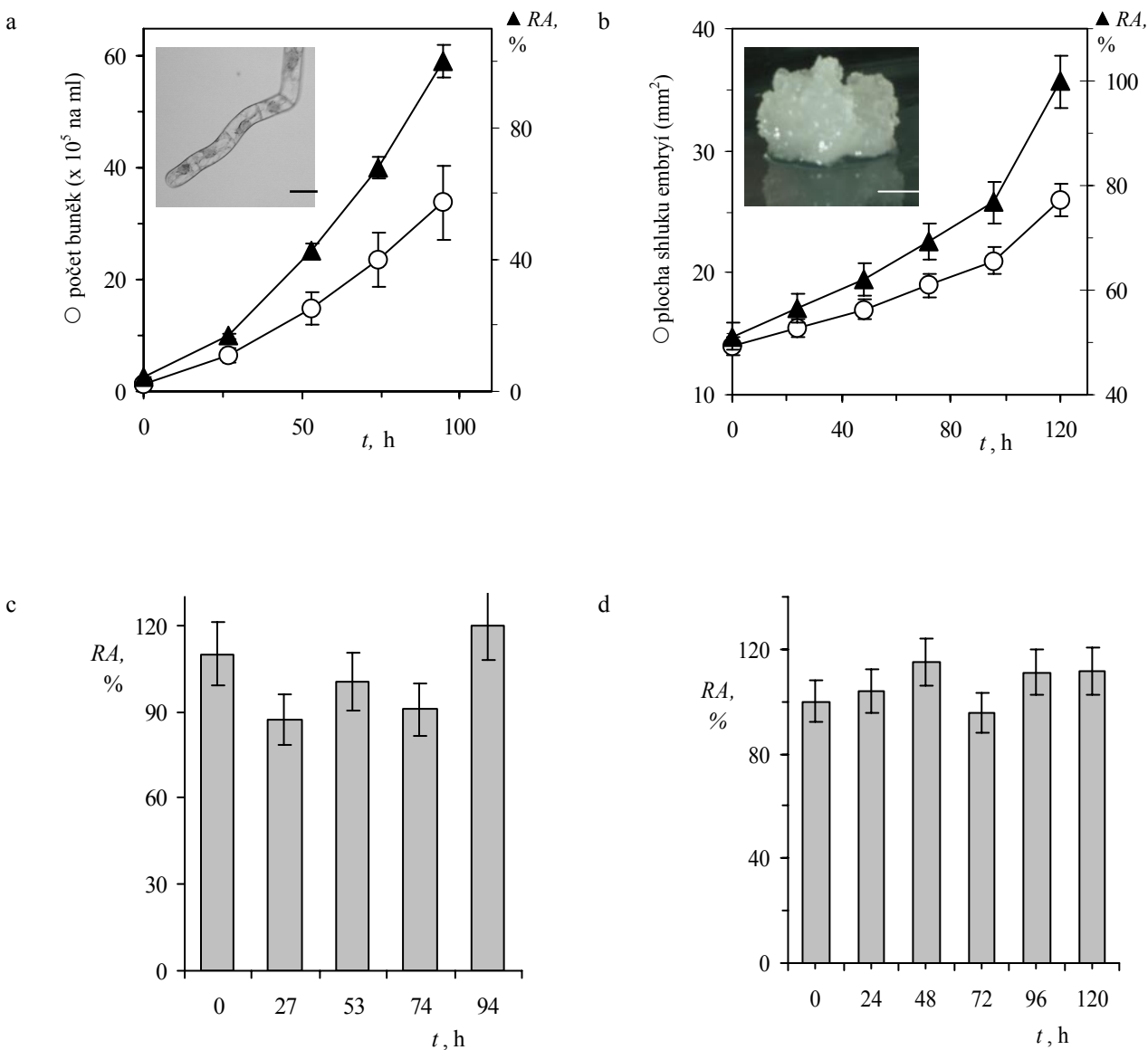
Nejdříve jsme se zabývali detekcí intracelulárních esterás v buněčné suspenzi tabáku linie BY-2, která je považována za jeden ze základních rostlinných modelů

Tabulka I
Substráty používané pro stanovení esterás

Substrát	Způsob detekce	Lit.
Ethyl-butyrát	alkalimetrycky	28
Estery 1- a 2-naftolu a alifatických karboxylových kyselin (C2–C4)	spektrofotometrycky	28,29
Estery 4-nitrofenolu a alifatických karboxylových kyselin (C2–C18)	spektrofotometrycky	30,31
Fluorescein-diacetát	spektrofotometrycky a spektrofotometrycky	14,15, 23
4-Methylumbelliferyl-acetát	Spektrofotometrycky	28



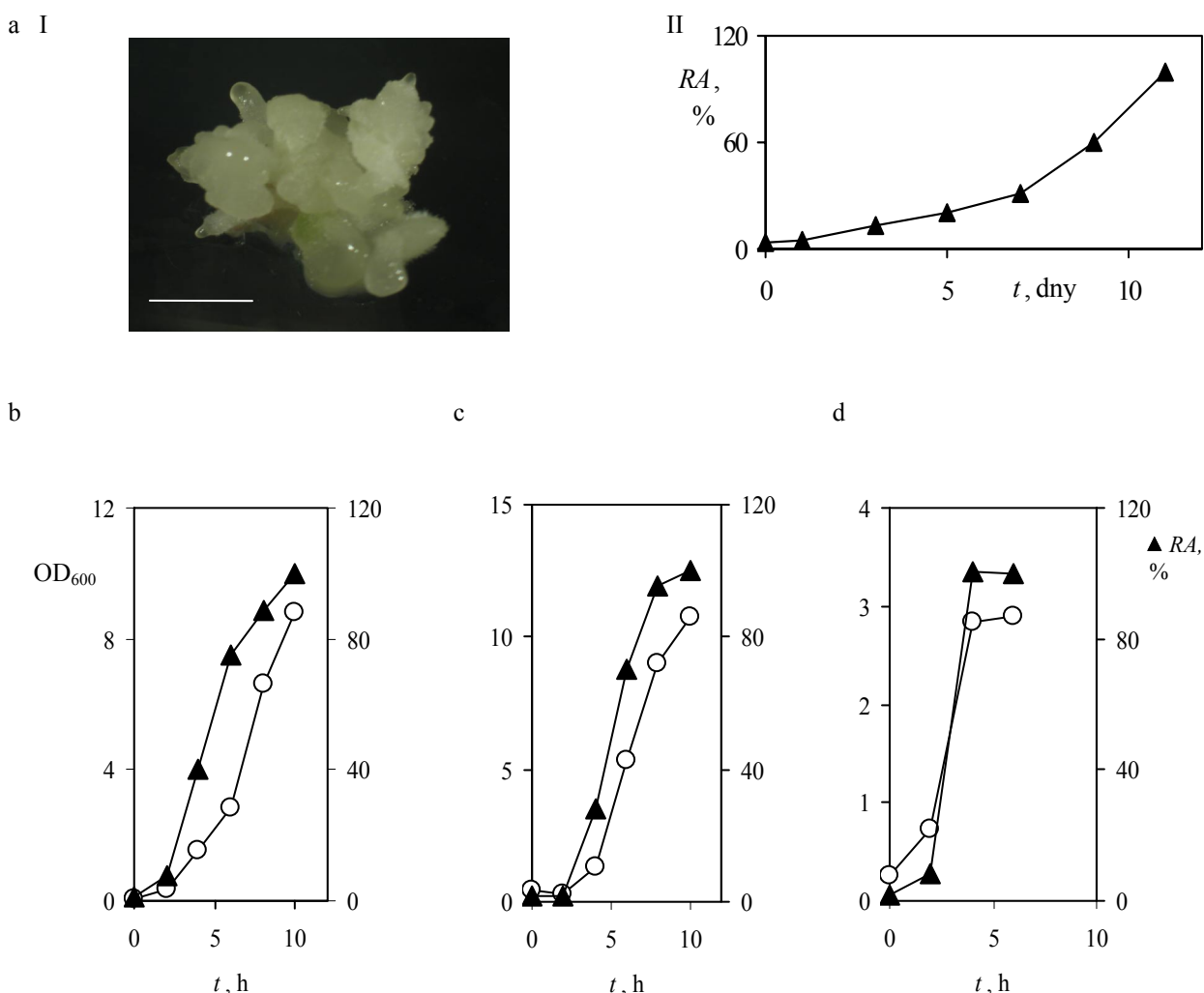
Obr. 1. Schéma reakce; fluorescein-diacetát je esterásami konvertován na fluorescein, který při $\text{pH} > 7,0$ vykazuje intenzivní fluorescenci; Ac – acetát



Obr. 2. Aktivita intracelulárních esteraz buněčné suspenze tabáku linie BY-2 a kultury raných somatických embryí smrku ztepilého (ESE); a – růstová křivka buněčné suspenze BY-2 stanovená na základě mikroskopického počítání buněk a aktivity intracelulárních esteraz. Vložený snímek ukazuje buňky BY-2. Úsečka představuje 50 μm ; b – růstová křivka kultury ESE stanovená na základě počítačové analýzy obrazu a aktivity intracelulárních esteraz. Vložený snímek ukazuje shluk ESE na mediu. Úsečka představuje 1 mm; c – aktivita intracelulárních esteraz 10^5 živých buněk BY-2 v závislosti na kultivační době; d – aktivita intracelulárních esteraz 100 ESE v závislosti na kultivační době; 100 % aktivity intracelulárních esteraz představuje: 0,002 mezinárodních jednotek (IU) na 1 ml buněčné suspenze (a), 0,0004 IU (b), $4,5 \cdot 10^{-5}$ IU (c) a $1,8 \cdot 10^{-5}$ IU (d); experimentální body představují průměrnou hodnotu třech měření \pm SD; RA – relativní aktivita intracelulárních esteraz, t – doba kultivace

vých systémů v biologii rostlin¹⁷. Morfologie BY-2 buněk je ukázána ve vloženém obrázku 2a. Aktivita intracelulárních esteraz byla stanovená v buněčném extraktu. Detekční limit stanovení esteraz s FDA jako substrátem představuje ekvivalent 800 živých buněk BY-2. Díky vysoké citlivosti

metody bylo možné použít malé množství vzorku buněčné suspenze (200 μl). Studovali jsme možnost, zda lze data získaná měřením aktivity intracelulárních esteraz využít ke konstrukci růstové křivky a nahradit tak časově náročné



Obr. 3. Aktivita intracelulárních esteraz suspenze cibule a bakteriálních kultur; a – snímek kalusu (I) cibule kuchyňské (úsečka představuje 3 mm) a růstová křivka suspenze cibule stanovená na základě intracelulárních esteraz (II); b – růstová křivka bakteriálních kultur *S. aureus* CCM 2022, c – růstová křivka bakteriálních kultur *S. epidermidis* CCM 4418, d – růstová křivka bakteriálních kultur *E. coli* CCM 3954 stanovená pomocí absorbance při 600 nm a intracelulárních esteraz; 100 % aktivity intracelulárních esteraz představuje: $5,9 \cdot 10^{-5}$ mezinárodních jednotek (IU) na 1 ml buněčné suspenze (a), $4,5 \cdot 10^{-5}$ IU (b), $8,6 \cdot 10^{-5}$ IU (c) a $7 \cdot 10^{-5}$ IU (d); RA – relativní aktivita intracelulárních esteraz, t – doba kultivace

přímé počítání buněk ve Fuchsově-Rosenthalově komůrce. Ze suspenze byly v daných časech odebírány vzorky pro stanovení životaschopnosti, hustoty suspenze (počet buněk na ml suspenze) a aktivity intracelulárních esteraz. Růstová křivka byla sestavena na základě počtu živých buněk (celkový počet buněk \times životaschopnost) v 1 ml suspenze a naměřených aktivit intracelulárních esteraz (obr. 2a). Přímé počítání vykazuje experimentální chybu až 20 %. Naproti tomu využití intracelulárních esteraz umožnilo významné snížení experimentální chyby (kolem 6 %) a získaná křivka je v dobré korelaci s přímým počítáním buněk (obr. 2a). Abychom prověřili, zda intracelulární

esterasy představují vhodný ukazatel využitelný pro konstrukci růstové křivky, byla sledována aktivita intracelulárních esteraz konstantního množství živých buněk v různých časech kultivace. Obr. 2c ukazuje, že se aktivita intracelulárních esteraz konstantního množství živých buněk v průběhu kultivační doby nemění. Porovnali jsme detekci živých buněk dvojím barvením FDA a PI s měřením aktivity intracelulárních esteraz^{13,25–27}. V živých buňkách způsobuje FDA zelenou fluorescenci, protože je schopen proniknout do cytoplazmy, kde je následně hydrolyzován esterazami na fluoreskující fluorescein, který již není schopen difundovat cytoplazmatickou membránou

zpět. Naproti tomu červená fluorescence způsobená PI ukazuje, že buňky jsou mrtvé, protože PI je schopen proniknout pouze poškozenou cytoplazmatickou membránou. Zjistili jsme, že obě metody jsou ve velmi dobré shodě, čímž jsme ověřili, že množství aktivních esterasy je přímo úměrné hustotě živých buněk v suspenzi. Kolísání naměřených hodnot je způsobeno experimentální chybou v počítání buněk.

Na rozdíl od buněčné suspenze tabáku představuje kultura tvořená shluky ESE (viz vložený obr. 2b) na tuhém mediu značně heterogenní systém. Růstová křivka byla sestavena na základě ploch shluků ESE zjištěných počítačovou analýzou obrazu¹². Paralelně byla sledována životaschopnost buněk a aktivita intracelulárních esterasy. Životaschopnost ($90 \pm 7\%$) se v průběhu experimentu neměnila. Aktivita intracelulárních esterasy rostla souběžně s plochou shluků ESE (obr. 2b). Abychom prověřili vhodnost použití intracelulárních esterasy jako markeru pro konstrukci růstové křivky ESE, byla sledována aktivita konstantního množství ESE. Ta zůstávala v průběhu experimentu konstantní (obr. 2d).

Na dvou diametrálně odlišných, dobře experimentálně definovaných rostlinných systémech jsme prověřili, že intracelulární esterasy mohou být využity pro určení růstové křivky. Proto jsme se pokusili ověřit metodiku stanovení aktivity intracelulárních esterasy na suspenzní kultuře cibule kuchyňské (obr. 3) a u různých druhů bakterií. Nově odvozená suspenzní kultura cibule je tvořena velkými shluky buněk v kapalném mediu. Tento charakter kultury zneumožňuje mikroskopické stanovení hustoty suspenze. Námí vypracovaná metoda stanovení aktivity esterasy umožnila ze získaných experimentálních dat sestavit růstovou křivku suspenzní kultury cibule. Pozorovaná závislost jasně ukazuje exponenciální fázi růstu buněk cibule v průběhu 11denního experimentu (obr. 3a II).

Na závěr jsme testovali možnost využití intracelulárních esterasy z bakteriálních kultur. Pro tyto účely byly použity tři rozdílné druhy bakterií: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* a *Escherichia coli*. V experimentu byl studován růst měřením OD₆₀₀ a aktivity intracelulárních esterasy. Ve všech třech případech korelovala růstová křivka stanovená na základě intracelulárních esterasy s křivkou získanou měřením OD₆₀₀. Na získaných experimentálních křivkách je velmi dobře pozorovatelná *lag*, *exponenciální* a *stacionární* fáze růstu. U bakteriálních suspenzí se pro stanovení počtu živých buněk standardně využívá kultivační metoda – část suspenze se nanese na tuhé medium a po řádově desítkách hodin se sleduje vznik kolonií bakterií²¹. Naproti tomu stanovení intracelulárních esterasy, které může kultivační metodu nahradit, vyžaduje přibližně 1 hodinu včetně přípravy vzorku.

Z výše uvedeného vyplývá, že esterasy mohou sloužit jako vhodný univerzální marker pro stanovení růstových charakteristik buněk jak eukaryotických, tak prokaryotických. Značnou výhodou představuje fakt, že se do stanovení aktivity intracelulárních esterasy promítnou pouze živé buňky, tedy takové, které přispívají k růstu kultury a event. produkují biotechnologicky významné metabolity.

U rostlinných buněčných suspenzí lze stanovením esterasy nahradit přímé počítání buněk, které je časově značně náročné a nepřesné. Esterasy lze dokonce využít i tam, kde kvůli přítomnosti velkých shluků buněk není přímé počítání možné.

Práce byla financována z dlouhodobého záměru Agronomické fakulty MZLU č. 4321 00001, FRVŠ 180/2004, GAČR č. 525/04/P132, 3/2004 IGA MZLU, IGA FaF VFU IG342012 a grantu Národního výzkumného centra LN00A081.

S e z n a m z k r a t e k a s y m b o l ů

BY-2	kultura tabáku (linie Bright Yellow 2)
FDA	fluorescein-diacetát
PI	propidium-jodid
IU	mezinárodní jednotka
ESE	raná somatická embrya smrku ztepilého
OD ₆₀₀	absorbance při 600 nm

LITERATURA

- Bornscheuer U. T.: FEMS Microbiol. Rev. 26, 73 (2002).
- Willats W. G. T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H. C., van Alebeek G.-J. W. M., Voragen A. G. J., Marcus S. E., Christensen T. M. I. E., Mikkelsen J. D., Murray B. S., Knox J. P.: J. Biol. Chem. 276, 19404 (2001).
- Sandermann H.: Trends Biochem. Sci. 17, 82 (1992).
- Cummins I., Burnet M., Edwards R.: Physiol. Plant. 113, 477 (2001).
- Stuhlfelder C., Lottspeich F., Mueller M. J.: Phytochemistry 60, 233 (2002).
- Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Kuban V.: Chem. Listy 97, 1003 (2003).
- Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: Chem. Listy 98, 166 (2004).
- Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: Listy Cukrov. 120, 222 (2004).
- Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: Bioelectrochemistry 63, 347 (2004).
- Zehnálek J., Vacek J., Kizek R.: Listy Cukrov. 120, 220 (2004).
- Jones K. H., Senft J. A.: J. Histochem. Cytochem. 33, 77 (1985).
- Petrek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: Anal. Bioanal. Chem., odesláno, (2005).
- Vitecek J., Adam V., Petrek J., Vacek J., Kizek R., Havel L.: Plant Cell, Tissue Organ. Cult. 79, 195 (2004).
- Amano T., Hirasawa K., O'Donohue M. J., Pernolle J., Schioi Y.: Anal. Biochem. 314, 1 (2003).

15. Steward N., Martin R., Engasser J. M., Goergen J. L.: *Plant Cell Rep.* 19, 171 (1999).
16. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
17. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.: *Int. Rev. Cytol.* 132, 1 (1992).
18. von Arnold S. J.: *Plant Physiol.* 127, 233 (1987).
19. Havel L., Durzan D. J.: *Int. J. Plant Sci.* 157, 8 (1996).
20. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: *Bioelectrochemistry* 60, 29 (2003).
21. Billova S., Kizek R., Jelen F., Novotna P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 362 (2003).
22. Mlejnek P., Prochazka S.: *Planta* 215, 158 (2002).
23. Guilbault G. G., Kramer D. N.: *Anal. Chem.* 36, 409 (1964).
24. www.molecularprobes.com, staženo 20.1.2004.
25. Vítěček J., Kizek R., Petřek J., Vacek J., Havel L.: *MendelNET*, 47 (2003).
26. Vítěček J., Kizek R., Petřek J., Vacek J., Havel L.: *5th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology*, 1, 159 (2003).
27. Vítěček J., Kizek R., Petřek J., Havel L.: *3. Metodické dny*, 73 (2003).
28. www.sigmaaldrich.com, staženo 8.12.2004.
29. Aldridge W. N.: *Biochem. J.* 53, 110 (1953).
30. Gilot P., Andre P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1661 (1995).
31. Choi Y.-J., Lee B. H.: *Bioproc. Biosyst. Eng.* 24, 59 (2001).

J. Vítěček, V. Adam, J. Petřek, P. Babula, P. Novotná, R. Kizek, and L. Havel (*Department of Plant Biology and Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Application of Fluorimetric Determination of Esterases in Plant Material**

Esterases show a great potential in plant biotechnology. In this article we report a simple method for assessment of their activity using fluorescein diacetate. The method was applied to cell suspension cultures of tobacco BY-2 line, a culture of early somatic embryos of Norway spruce on a semisolid medium and to a suspension culture of onion. We demonstrated that the intracellular esterases can be used for construction of growth curves of the above mentioned cultures. In addition, we tested the method on suspension cultures of onion and bacteria.

40. konference

POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – „LIBLICE 2005“

Sportovní Centrum Nymburk, 18.–20. listopadu 2005

Vážení kolegové,

Odborná skupina organické, bioorganické a farmaceutické chemie České společnosti chemické si Vás dovoluje pozvat na tradiční fórum českých a slovenských chemiků. Vedle zvaných hlavních přednášek (40+5 min) a (25+5 min) budou tvořit náplň konference krátká původní sdělení (10+5 min) a postery (0,85 × 0,85 m). Tématika těchto příspěvků nemusí navazovat na výše uvedené referáty. Vítána jsou sdělení z oblastí, které leží na hranici okruhu témat vytčených názvem konference. Podrobnosti a formuláře naleznete na webové stránce naší odborné skupiny, <http://uoch.vscht.cz/orbifachos/>. **Uzávěrka přihlášek a abstraktů je 5. září 2005.** V případě, že nemáte přístup k e-mailu nebo budete potřebovat další informace, kontaktujte, prosím, organizátory konference, prof. Pavla Drašara, tel. 220 444 283, fax 233 339 990, e-mail Pavel.Drasar@vscht.cz, nebo doc. Jaroslava Kvíčalu, tel. 220 444 242, fax 220 444 278, e-mail kvicalaj@vscht.cz.