



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Stanovení základních charakteristik protilátek
proti auxinům

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jana Kratochvílová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jana Oklešťková, PhD.
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jana Kratochvílová
Název práce	Stanovení základních charakteristik protilátek proti auxinům
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jana Oklešťková, PhD.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	Protilátky jsou látky bílkovinné povahy a jsou produkovány B – lymfocyty jako součást imunitní odpovědi. Mají schopnost specificky rozpoznat a vázat antigen. Interakce protilátky a antigenu je základem imunochemických metod, které mají široké uplatnění v biologii i medicíně pro diagnostické a terapeutické účely. Cílem této práce bylo otestovat a určit základní charakteristiky 3 typů protilátek proti rostlinným hormonům – auxinům. Protilátka s nejlepšími vlastnostmi byla následně použita pro přípravu imunoafinitního gelu a izolaci endogenních auxinů z rostlinného materiálu.
Klíčová slova	auxiny, enzymová imunoanalýza, imunoafinitní chromatografie, protilátky
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jana Kratochvílová
Title of thesis	Determination of basic characteristics of antibodies against auxins
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Oklešťková, PhD.
The year of presentation	2017
Abstract	Antibodies are immunoglobulins produced by B – lymphocytes. They have the ability to specifically recognize and bind the antigen. Interaction between antibody and a antigen is the principle of immunochemical methods which are widely used in biology and medicine for diagnostic and therapeutic purposes. The aim of this study was to test and determine the basic characteristics of three types of antibodies against plant hormones – auxins. The antibody with the best characteristics was subsequently used for preparation of the immunoaffinity gel and isolation of endogenous auxin from plant material.
Keywords	antibodies, auxins, enzyme-linked immunosorbent assay, immunoaffinity chromatography
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Janě Oklešťkové, PhD. za odbornou pomoc, cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Aleši Pěnčíkovi, PhD. za UHPLC-MS/MS měření a kvantifikaci endogenních auxinů a všem pracovníkům Laboratoře růstových regulátorů za vytvoření vhodných podmínek při provedení experimentální části této bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Protilátky	10
2.1.1	Charakteristické vlastnosti a struktura protilátek	10
2.1.2	Monoklonální x Polyklonální protilátky	12
2.2	Příprava protilátek	14
2.3	Auxiny	15
2.3.1	Hlavní fyziologické účinky auxinů	18
2.4	Afinitní chromatografie	18
2.5	Enzymová imunoanalýza	19
3	Materiál a metody	21
3.1	Chemikálie a přístroje	21
3.2	Metody práce	23
3.2.1	Čištění protilátek	23
3.2.2	Rozpuštění a dialýza protilátek	23
3.2.3	ELISA testy	24
3.2.4	Křížová reaktivita	25
3.2.5	Příprava média a vertikálních desek	26
3.2.6	Sterilizace semínek před výsevem	26
3.2.7	Výsev	26
3.2.8	Extrakce vzorků pro analýzu IAA	27
3.2.9	Extrakce na pevné fázi	28
3.2.10	Methylace	28
3.2.11	Příprava imunoafinitního gelu	28
3.2.12	Imunoafinitní chromatografie	29
4	Výsledky	30
4.1	Příprava protilátek	30

4.2	Základní parametry ELISA testu	30
4.3	Specifita protilátek	33
4.4	Kapacita imunoafinitního gelu	35
4.5	Výsledky měření reálných vzorků	35
5	Diskuze.....	37
6	Závěr	39
7	Seznam literatury.....	40

Seznam použitých zkratek

Ab – protilátka (antibody)

Ag – antigen

BCR – B-buněčný receptor (B-cell region)

BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)

CDR – oblasti určující komplementaritu (complementary-determining region)

DEDTCA – diethyldithiokarbamová kyselina

ELISA – enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)

Fab fragment – fragment vážící antigen (fragment antigen binding)

Fc fragment – krystalizující fragment (fragment crystallizable region)

IAA – indol-3-octová kyselina

IAA-Me – methyl ester indol-3-octové kyseliny

Ig – imunoglobulin

IS – interní standardy

MOPS – 3-morfolinopropansulfanová kyselina

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

MS – Murashige & Skoog médium

oxIAA – 2-oxindol-3-octová kyselina

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

SPE – extrakce tuhou fází (solid phase extraction)

UHPLC – ultra účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

1 Úvod

Protilátky jsou látky bílkovinné povahy, které vznikají pouze v živém organismu jako odpověď na cizorodou látku. Skládají se ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců navzájem spojených disulfidovými můstky, které zajišťují odolnost a stabilitu protilátky. Celá molekula potom zaujímá tvar písmena ypsilon. Dělí se na fragment Fc, který se váže na Fc receptor leukocytů a dva fragmenty Fab, pomocí nichž se specificky váží na antigen (tato vazba je tvořena nekovalentními interakcemi). Podle těžkých řetězců lze odlišit jednotlivé třídy protilátek. Rozlišujeme monomery IgD, IgE, IgG, dimery IgA a pentamery IgM. Immunoglobulin G je nejvýznamnější třídou protilátek, jeho hlavní funkcí je vazba na antigen.

Auxiny jsou skupinou rostlinných hormonů, které působí i ve velmi nízkých koncentracích a ovlivňují růst buněk. Za auxiny považujeme látky různého chemického složení, které mají podobnou biologickou aktivitu. První auxin byl objeven ve 30. letech minulého století, a to kyselina indol-3-octová (IAA). Kromě auxinů, které se v rostlinách vyskytují přirozeně, byla do dnešní doby připravena i celá řada jejich syntetických derivátů. Auxiny se podílejí na řízení mnoha procesů v rostlině, nejvíce však ovlivňují dělení, dlouhivý růst a diferenciaci vodivých pletiv.

Cílem mé bakalářské práce bylo vyizolovat a určit základní charakteristiky 3 typů protilátek proti rostlinným hormonům auxinům. Byly testovány dvě polyklonální protilátky – anti – oxIAA a anti – IAA-N (konjugovaná přes dusík) a jedna monoklonální protilátka anti – IAA spojená přes karboxylovou skupinu s hovězím sérovým albuminem (IAA-C1'-BSA). Testováním bylo zjištěno, že nejlepší afinitu k auxinům má monoklonální protilátka, pomocí níž byl připraven imunoafinitní gel, který byl použit při extrakci a purifikaci IAA a jejích derivátů z rostlinného materiálu.

2 Teoretická část

2.1 Protilátky

Protilátky (imunoglobuliny – Ig) jsou rozpustné glykoproteiny tvořené z 82–96 % polypeptidy a ze 4-18 % cukry. Většinu biologických vlastností molekul protilátek nese polypeptidický řetězec. Vznikají jako odpověď organismu na cizorodou látku (*Stites a Terr, 1994*). Mají schopnost specificky vázat antigen s vysokým stupněm afinity. Interakce protilátka-antigen tvoří základ širokého využití protilátek v biotechnologických a medicínských aplikacích (*Ayyar et al., 2011*).

Protilátky jsou součástí imunitního systému obratlovců a na základě odlišných strukturních a biologických vlastností se rozdělují do 5 hlavních tříd – A, D, E, G a M. Imunoglobuliny třídy G (IgG) patří z hlediska imunitní odpovědi mezi nejdůležitější (*Delaunay et al., 2000*).

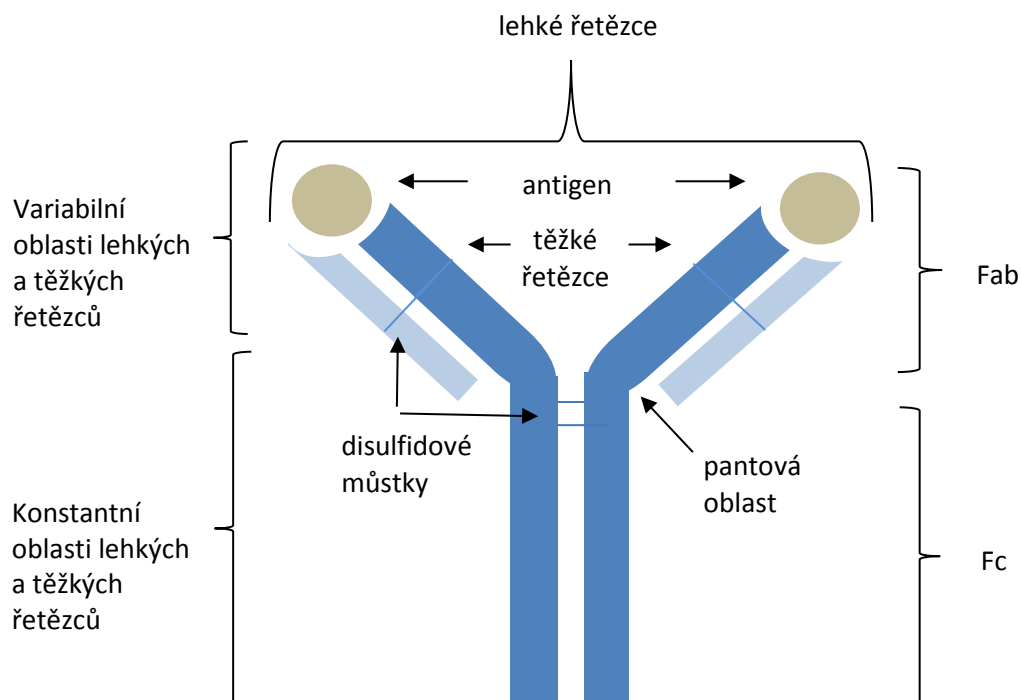
2.1.1 Charakteristické vlastnosti a struktura protilátek

Typická molekula imunoglobulinu má molekulovou hmotnost 150-200 kDa a je tvořena čtyřmi polypeptidovými řetězci. Dva lehké řetězce mají hmotnost přibližně 23 kDa, dva těžké řetězce asi 50-80 kDa (*Peakman a Vergani, 2009*). Tyto řetězce jsou navzájem propojeny disulfidovými můstky a celý imunoglobulin potom zaujímá tvar pomyslného písmene Y. Na N-koncové části polypeptidického řetězce se nachází dvě identická místa, do kterých se váže antigen. Opačný konec řetězce se označuje jako Fc (crystallizable fragment). Dále se těžké a lehké řetězce dělí na variabilní (V) a konstantní (C) oblasti. Variabilní oblasti obou řetězců obsahují tři hypervariabilní místa. Tyto hypervariabilní domény tvoří komplementární oblasti (CDR – complementary-determining region). V těchto částech interagují lehké a těžké řetězce s antigenními determinantami (epitopy) pomocí vodíkových můstků, iontových, hydrofobních a Van der Waalsových sil (*Delaunay et al., 2000*).

Molekulu imunoglobulinu lze rozštěpit proteolytickým enzymem papainem. Papain štěpí imunoglobulin v pantové oblasti, čímž vznikají dva identické antigen vážící fragmenty Fab a jeden Fc fragment (*Roitt, 1981*).

Fab fragment zahrnuje dvě konstantní a variabilní domény obou lehkých a těžkých řetězců a obsahuje vazebné místo pro antigen. Fc doména zahrnuje 2-4 konstantní domény těžkého řetězce, má určité efektorové funkce a slouží také k odlišení

jednotlivých tříd protilátek. Struktura protilátky je zobrazena na obrázku 1 (Ayyar *et al.*, 2011).



Obr. 1: Chemická struktura imunoglobulinu IgG (převzato a modifikováno dle Ayyar *et al.*, 2011)

Variabilní oblasti lehkých a těžkých řetězců obsahují vazebné místo, které je uzpůsobeno struktuře na povrchu antigenu (epitopu) svým tvarem a rozložením nábojů (Hořejší a Bartůňková, 2009). Při navázání antigenu do vazebného místa vzniká imunokomplex, který je reverzibilní (má určitou rychlost vzniku a rozpadu). Rovnovážná (asociační) konstanta K_{as} nám definuje poměr rychlostních konstant vzniku a rozpadu imunokomplexu. Pro komplex antigen-protilátka je tato rovnovážná konstanta v rozmezí $10^6 - 10^{12}$ l/mol. Čím vyšší je K_{as} , tím vyšší je afinita protilátky k antigenu.

Známe dva typy lehkých řetězců, κ a λ (Hořejší a Bartůňková, 2009). Tyto řetězce se od sebe navzájem odlišují primární strukturou konstantních domén a jsou kódovány odlišnými geny. Jinak jsou si ale velmi podobné. Mají především stejnou velikost, ale také strukturní a funkční vlastnosti. Dále známe 5 typů těžkých řetězců. Genové úseky, které kódují konstantní části izotopů, jsou seřazeny tandemově na jediném chromozomu. Těžké řetězce se poté nazývají μ , δ , γ , α a ϵ . Protilátky, které jsou tvořeny těmito typy (třídami) těžkých řetězců označujeme jako IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Imunoglobuliny IgM a IgD se nachází na povrchu B buněk a tvoří BCR (B – buněčný receptor na povrchu B-lymfocytů). IgG a IgE jsou lokalizovány v séru a

intersticiální tekutině, IgA se ve velké míře vyskytuje na povrchu sliznic, ve slinách a slzách.

Tab. 1: Hlavní účinky imunoglobulinů (*Hořejší a Bartůňková, 2009*)

IgM	časná imunitní odpověď, aktivace komplementu, receptor pro antigen
IgD	membránový receptor pro antigen
IgG	opsonizace, neutralizace, sekundární odpověď, prostupuje přes placentu
IgA	hlavní protilátka sliznic, opsonizace
IgE	obránné reakce proti parazitům

2.1.2 Monoklonální x Polyklonální protilátky

Monoklonální protilátky mají vysokou specifitou vůči antigennímu epitopu. Přípravují se technologicky náročným způsobem, tzv. buněčnou fúzí myších splenocytů s buňkami myšího myelomu, kterou poprvé popsali G. Köhler a C. Milstein v roce 1975 (*Köhler a Milstein, 1975*). Takto vzniklá hybridní buňka, tzv. hybridom získá po lymfocytu B schopnost tvořit protilátky a po buňce myelomu schopnost nekonečně se dělit (*Vrána et al., 2011*). Hybridom produkuje protilátku žádané kvality do média a je získána standardní reagentie téměř v jakémkoli množství (*Lukáš et al., 1997*). První použitou monoklonální protilátkou v klinické praxi byl Muromonab-CD3, který snižuje rejekci při transplantaci orgánů (*Viklický et al., 2008*). V lidském těle se však myší monoklonální protilátky chovají jako xenoantigeny a vyvolávají velmi výraznou imunitní reakci. Tato odpověď imunitního systému rychle eliminuje biologickou aktivitu monoklonálních protilátek při opakovaném použití (*Krejsek a Kopecký, 2004*). Proto

došlo k vytvoření chimérických protilátek, které mají konstantní řetězce nahrazeny lidskými, přičemž myší variabilní řetězce zůstávají zachovány. První chimérickou protilátkou byl abciximab (*Morrison et al., 1984*). Následně byly vyvinuty humanizované protilátky, u kterých se také střídají lidské a myší sekvence. U těchto protilátek jsou ale myší sekvence zachovány pouze v hypervariabilní oblasti CDR, která je odpovědná za vazbu antigenu (*Jones et al., 1986*). Devadesátá léta minulého století byla velkým milníkem, jelikož byly vytvořeny plně lidské monoklonální protilátky. Byly rozvinuty metody založené na klonování variabilních sekvencí protilátek a jejich selekci vůči antigenu prostřednictvím bakteriofágů (*McCafferty et al., 1990*) a později také pomocí transgenních myší. Geny myší, které kódují imunoglobuliny, byly nahrazeny lidskými (*Lonberg et al., 1994*). Monoklonální protilátky můžeme využít v mnoha oblastech klinické praxe. Nejpropracovanější postupy jsou při aplikacích v nádorové imunologii. Tyto protilátky lze ale využít i jinak, a to jako nosiče, které mohou cíleně nést diagnostické markery anebo také léčiva k cílovým tkáním nebo buňkám (*Krejsek a Kopecký, 2004*).

Polyklonální protilátky představují heterogenní směs (*Lukáš et al., 1997*). Získávají se konvenčním způsobem, a to odběrem krve po opakované imunizaci pokusného zvířete (nejčastěji králíka). Při použití stejného antigenu se tato směs polyklonálních protilátek liší nejenom u různých zvířat, ale i u téhož zvířete, a to mezi jednotlivými odběry. Směs obsahuje protilátky, které mají rozmanitou specifitu a afinitu k antigenu. Dále obsahuje protilátky nejen různých tříd, ale i podtříd, a i rozličných biologických a fyzikálně – chemických vlastností. Přečištěné polyklonální protilátky jsou s úspěchem používány v imunochemických metodách.

2.2 Příprava protilátek

Imunoglobuliny se nejčastěji izolují z krevního séra, jen v ojedinělých případech z jiných tělních tekutin a růstových médií (*Ferenčík, 1989*). Používají se přitom různé metody, které umožňují přípravu imunoglobulinů s různým stupněm čistoty a imunochemické aktivity.

Čištění imunoglobulinů pomocí afinitní chromatografie využívá strukturu jejich domény (*Huse et al., 2002*). Strategii čištění lze tedy vyvodit z jejich stavby. První metoda využívá schopnosti specificky vázat antigen anebo se zaměřuje na konstantní část protilátky – fragment Fc (specifické metody). Nespecifické metody jsou používány obecně pro purifikaci proteinů. Rozdělení nespecifických a specifických metod je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2: Rozdělení metod pro čištění protilátek (upraveno dle *Ferenčík, 1989*)

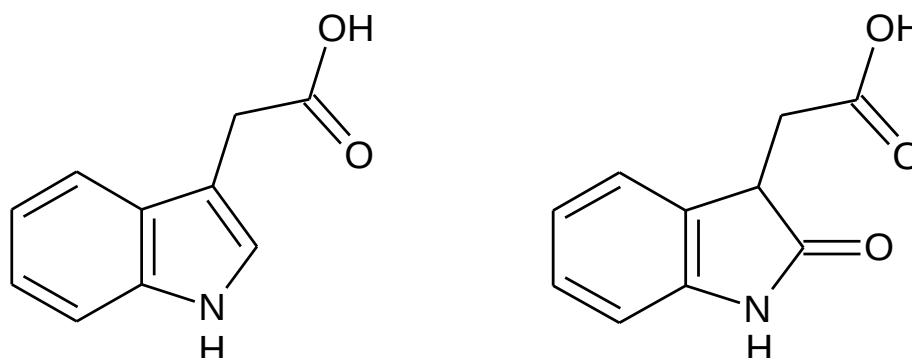
Nespecifické metody	Specifické metody
Frakční precipitace	Imunoafinitní chromatografie
Elektroforetické metody	Chromatografie na proteinu A, G, L
Izoelektrická fokusace	
Ionexová chromatografie	
Gelová filtrační chromatografie	
Hydrofóbní chromatografie	

Nespecifickými metodami jsou izolovány imunoglobuliny určité třídy, ale také podtřídy (*Ferenčík, 1989*). Představují heterogenní populaci molekul a mají různou specifitu vazebných míst. Ve směsi polyklonálních protilátek jsou přítomny různé idiotypy. Tyto idiotypy vznikly jako odpověď na antigeny, se kterými přišel dárce do styku. Při specifických metodách je použit pouze jeden čistý antigen, díky kterému je umožněna izolace polyklonálních protilátek, které jsou specificky omezeny pouze na determinanty, jenž se nachází na použitém antigenu.

2.3 Auxiny

Auxiny jsou důležitou skupinou rostlinných hormonů, které lze nalézt ve všech suchozemských rostlinách a u několika živočichů žijících v půdě. Tento hormon byl jedním z prvních identifikovaných fytohormonů (Woodward a Bartel, 2005), v 19. století byl objeven Charlesem Darwinem a jeho synem Francisem při studiu jednoděložných koleoptilí. Sledovali především tvorbu, polární transport a tropizmy (Nishimura et al., 2009). Za oficiálního objevitele je ale považován Fritz Warmolt Went, který izoloval chemickou látku zodpovědnou za ohyb, kterou pojmenoval auxin (z řeckého *auxein* – růst) (Went, 1928).

Primárním a přirozeným auxinem je slabá organická indol-3-octová kyselina (IAA, viz obrázek 2). Je tvořena indolovým kruhem, na němž je navázán postranní řetězec nesoucí karboxylovou skupinu, která je při nízkém pH protonována a snáze difunduje přes buněčné membrány (Ljung, 2013).

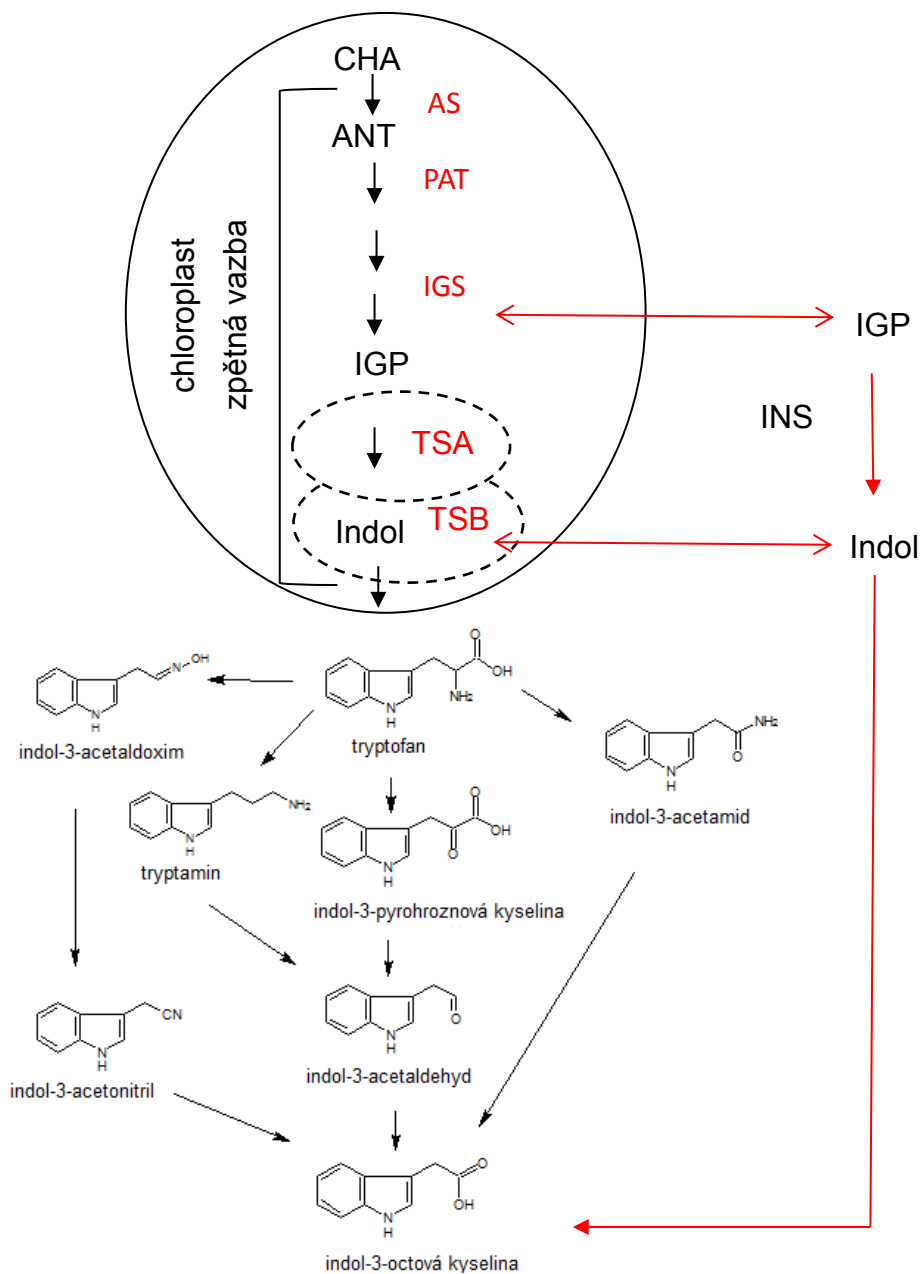


Obr. 2: Chemická struktura indol-3-octové a 2-oxindol-3-octové kyseliny

Auxiny se tvoří v nízkých koncentracích ve všech rostlinných tkáních, místa s největší syntézou jsou ale v apikálních meristémech a mladých listech (Ljung et al., 2001). Z tkání jsou transportovány polárním transportem, který vzniká brzy v embryonálním vývoji a je řízen chemiosmotickým potenciálem (Goldsmith, 1977). Transport ve stonku je bazipetální – dochází ke snižování hladiny IAA od vrcholu k bázi (v kořenech akropetální) (Procházka et al., 1998). Na dlouhé vzdálenosti jsou transportovány floémem společně s asimiláty. Na krátké vzdálenosti prochází nedisociované auxiny volně přes cytoplazmatickou membránu, v případě disociovaných do buňky vtékají pomocí specifických přenašečů rodiny AUX/LAX a výtokovými přenašeči rodiny PIN jsou transportovány ven (Enders a Strader, 2015).

Auxiny se mohou kovalentně navázat na sloučeniny s vysokou nebo nízkou molekulovou hmotností, a to zejména v semenech a zásobních orgánech. Enzymatickými procesy pak mohou být rychle uvolněny z mnoha sloučenin, a tak sloužit jako zásobní forma a regulovat hladinu volného auxinu (Taiz a Zeiger, 2010).

Syntéza je tedy možná hydrolýzou auxinových konjugátů, anebo syntézou *de novo* (Nomanly, 2010). V této souvislosti bylo navrženo 5 biosyntetických drah. Čtyři jsou vzájemně propojené a závislé na tryptofanu, který je zpracován na IAA drahou indol-3-acetaldoximu (IAOx), drahou tryptaminu (TAM), drahou indol-3-pyrroloquinolínové kyseliny (IPyA) nebo drahou indol-3-acetamidu (IAM); a jedna dráha na tryptofanu nezávislá, která vychází z indolyl-3-glycerofosfátů (IGP), viz obrázek 3 (Tivendale et al., 2014). Odbourání IAA je uskutečněno dvěma oxidacemi. V prvním případě se indolová skupina IAA oxiduje na kyselinu oxindol-3-octovou a následně na glukózu. V jiné dráze se IAA může konjugovat s aspartátem a oxidovat se na oxIAA (Taiz a Zeiger, 2010).



- dráha nezávislá na tryptofanu
- dráha závislá na tryptofanu

Obr. 3: Biosyntetické dráhy IAA. ANT, anthranilát; AS, anthranilát syntáza; CHA, kyselina chorismová; IGP, indol-3-glycerolfosfát; IGS, indol-3-glycerolfosfát syntáza; PAT, fosforibosylanthranilát transferáza; TSA, tryptofan syntáza α ; TSB, tryptofan syntáza β ; (převzato a modifikováno dle Normanly et al., 1993, Wang et al., 2015)

2.3.1 Hlavní fyziologické účinky auxinů

Auxiny hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin. Jedním z hlavních účinků auxinů je stimulace dlouhivého růstu (*Evans a Hokanson, 1969*), regulace tropismů (*Shen-Miller et al., 1969*), diferenciací vodivých pletiv (*Hollis a Tepper, 1971*), apikální dominance (*Phillips, 1975*) a senescence (*Morgan a Durham, 1972*).

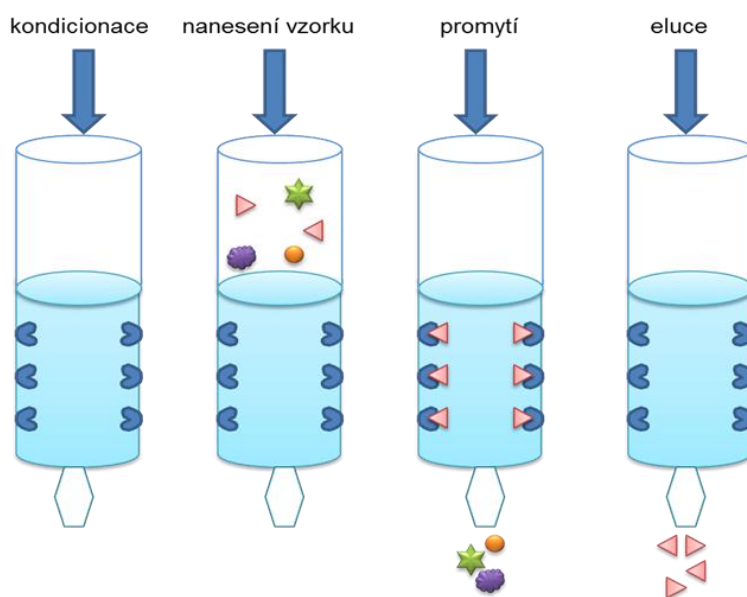
Stimulace dlouhivého růstu je vyvolána koncentrací auxinu v rozmezí 10^{-7} – 10^{-5} mol/l. S touto stimulací je spojena regulace tropismů (gravitropismus a fototropismus), kdy vlivem jednostranného osvětlení dochází k nerovnoměrné distribuci IAA, a tak k nerovnoměrnému růstu a ohybu (*Hejnák et al., 2005*). Auxiny ovlivňují apikální dominanci, po produkci vzrostným vrcholem jsou transportovány směrem dolů a inhibují růst postranních pupenů (vrcholový pupen dominuje nad vrcholy postranními) (*Ryplová, 2014*). Klasický experiment byl proveden na fazolích ve 20. letech minulého století (*Skoog a Thimann, 1934*). Podobně je auxiny zprostředkována dominance plodů, kdy plod, který bazipetálně transportuje největší množství auxinu, brzdí vývoj okolních plodů a sám roste. S tím souvisí úloha regulace senescence. Dokud je transport IAA opadovou zónou funkční, jsou buňky, které se zde nachází, živé. Při zastavení transportu nastává lytický proces – opad listů nebo plodů (*Procházka et al., 1998*). Významným účinkem auxinů je diferenciací vodivých pletiv. Tím je usnadněn transport dalších fytohormonů rostlinou. Vodivá pletiva se těsně pod vzrostným vrcholem diferencují z prokambia (*Ryplová, 2014*).

2.4 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je separační analytická technika, která je založena na reversibilní interakci mezi proteinem a jeho ligandem (imunoafinitní chromatografie - na vazbě antigenu ke specifické protilátce) (*Ayyar et al., 2011*). Specifita vazby je zajištěna ligandem, který je většinou využit pro selektivní absorpci cílového proteinu ze směsi. Ten je následně eluován pomocí buď kompetitivních analogů, denaturačních činidel nebo změnou reakčních podmínek jako je pH, iontová síla, nebo polarita. Afinitní chromatografie se skládá z pevné (stacionární) a kapalné (mobilní) fáze. Ideální stacionární fáze by měla být jednotná, makroporézní, hydrofilní, chemicky a mechanicky odolná, selektivní, vykazující minimum nespecifických interakcí a nerozpustná v elučním rozpouštědle. Pevné fáze pro afinitní

chromatografii mohou být rozděleny do tří skupin – přírodní (agarosa, celulóza), syntetické (akrylamid, polystyren), anebo anorganické.

Imunoafinitní chromatografie je tedy proces, při kterém se vazebná afinita antigenu (Ag) a protilátky (Ab) používá jako základ separace (Subramanian, 2002). Protilátka specifická pro daný antigen je imobilizována na pevném nosiči za vzniku imunosorbentu. Složitá směs reaktantů je vedena přes imunosorbent, přičemž antigeny jsou specificky zachyceny na protilátce, kdežto ostatní balastní látky jsou odmyty. Reverzibilní interakce mezi antigenem a protilátkou může být narušena elučním činidlem, čímž se získá vysoce čistý produkt, viz obrázek 4.



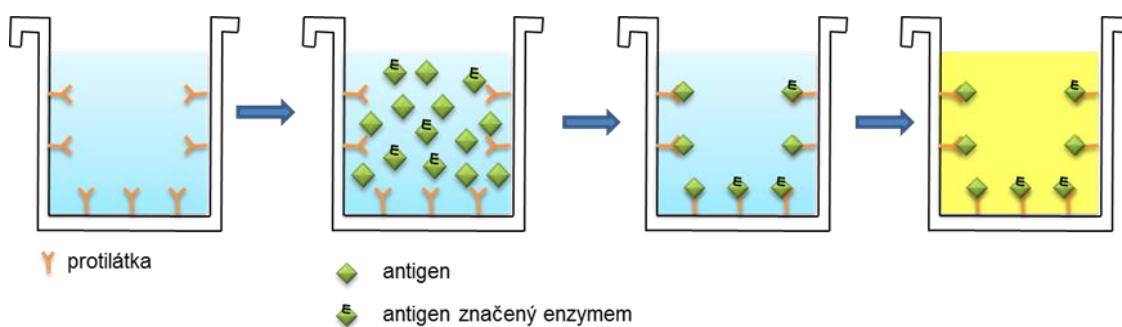
Obr. 4: Princip imunoafinitní chromatografie

2.5 Enzymová imunoanalýza

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je přímý vazebný test na protilátky anebo antigeny. Tyto testy jsou často využívány k diagnostice virových onemocnění. Pro standardizaci testu je nezbytná příprava známého antigenu nebo protilátky (Murphy, 2012). Existuje více uspořádání ELISA testu, podle toho, zda se jedná o kompetitivní či nekompetitivní typ, anebo podle stanovovaného reaktantu na pevné fázi (Litzman et al., 2007).

ELISA test nejčastěji probíhá v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Specifická protilátka pro antigen, který se má stanovit, se naváže na pevnou fázi. Přidá se antigen značený enzymem ve známém množství. Následně se přidá buď

známé (standardní) nebo neznámé (analyzované) množství neoznačeného antigenu. Deska je inkubována a dochází ke kompetici označeného antigenu se standardním nebo zkoumaným neoznačeným antigenem. Po uplynutí inkubační doby se jamka v destičce (reakční prostor) promyje roztokem, čímž se odstraní volné reaktanty. V jamce zůstanou pouze označené a neoznačené antigeny, jenž jsou navázány na stěnu jamky, tzn. na imobilizovanou protilátku. Dále je přidán roztok substrátu. Enzym, který je přítomen v imunokomplexech, rozloží tento substrát za vzniku barevného produktu (*Ferenčík, 1989*). Změna barvy reakčního roztoku je tedy pozitivní reakcí. Intenzita zbarvení se spektrofotometricky změří. Nejedná se pouze o metodiku kvalitativní, ale také o kvantitativní, protože intenzita výsledného zbarvení je v určitém rozmezí koncentrací přímo úměrná množství protilátky, která se navázala, takže také koncentraci prokazovaného antigenu ve vzorku, viz obrázek 5 (*Litzman et al., 2007*).



Obr. 5: Princip enzymové imunoanalýzy

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie

Affigel 10 (BioRad, Německo), azid sodný (Sigma-Aldrich, USA), ethanol (VWR chemicals, ČR), ethanolamin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA), fytoagar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), hydrogenuhličitan sodný (Lachema, ČR), hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR), interní standardy auxinů (Olchemim, ČR), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR), kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA), methanol (Lach-Ner, ČR), Murashige & Skoog médium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), *p*-nitrofenylfosfát (Sigma-Aldrich, USA), sacharóza (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), síran amonný (Lach-Ner, ČR), standardy auxinů (Olchemim, ČR)

Složení roztoků

MOPS pufr: 20,93 g kyseliny 3-morfolinopropansulfanové, 17,53 g NaCl na 1 litr destilované vody; pH 7,2

PBS pufr: 0,87 g NaCl, 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ na 1 litr destilované vody; pH 7,2

PBS pufr pro dialýzu: 9 g NaCl, 17,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ na 1 litr destilované vody; pH 7,2

Pufry pro ELISU:

BSA: 200 mg na 1 litr TBS pufru

Koutovací pufr: 4,2 g NaHCO_3 na 1 litr destilované vody, pH 9,6

NaOH: 9,99 g, 0,5 M na 0,5 litru destilované vody

TBS pufr: 6,05 g Tris, 0,203 g $\text{MgCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,584 g NaCl na 1 litr destilované vody, pH 7,5

Přístroje

Analytické váhy – CPA225D, Sartorius, Německo

Centrifuga – Heraeus Biofuge Stratos, Trigon plus, Česká republika

Kulový mlýnek – HM 301, Retsch, Česká republika

Laminární flowbox – Heto-Holten, Dánsko

pH metr – Eutech Instruments, Nizozemsko

Plate reader, Labsystems Multiscan Plus, Finsko

Ultrazvuk – Elmasonic S10, Elma, Česká republika

UV – VIS 1601 spektrofotometr, Shimadzu, Japonsko

Vakuový manifold – Visiprep, Supelco, USA

Vortex – Velp Scantifica, Chemos, Česká republika

3.2 Metody práce

3.2.1 Čištění protilátek

Protilátky mohou být čištěny různými způsoby na základě jejich jedinečných fyzikálních a chemických vlastností, jako je velikost, rozpustnost, náboj, hydrofobicita a vazebná afinita. V této práci byly protilátky vysráženy síranem amonným, jakožto vhodný první krok při čištění protilátek. Princip srážení spočívá ve „vysolování“ proteinů z roztoku. Těmto proteinům je zabráněno tvořit vodíkové vazby s vodou a sůl umožňuje jejich vzájemnou interakci mezi sebou. Vytváří se agregáty, které se poté vysráží z roztoku (*Grodzki a Berenstein, 2010*).

K přípravě čistých protilátek precipitační metodou byl použit nasycený roztok síranu amonného, pH 7,2. Bylo smícháno 5 ml krevního séra (polyklonální protilátky) nebo ascitu (monoklonální protilátka) se 2 ml PBS pufru (0,87 g NaCl; 7,8 g NaH₂PO₄ · 2 H₂O/l; pH 7,2). Tato směs byla přenesena do vhodné centrifugační zkumavky a za stálého míchání k ní bylo pomalu přikapáno 7 ml roztoku síranu amonného. Následně byla směs promíchána na vortexu a byla ponechána 20 minut při laboratorní teplotě, přičemž byla ještě opět lehce promíchána. Dále následovala centrifugace, která trvala 20 minut při teplotě 4 °C a při 10 000 rpm.

3.2.2 Rozpuštění a dialýza protilátek

Dialýza je proces, při kterém se oddělují velké molekuly od malých molekul přes polopropustnou membránu (*Berg et al., 2012*). Směs proteinů se umístí do dialyzační trubice. Tato trubice je poté ponořena do pufru, který neobsahuje malé molekuly, jenž mají být následně odděleny. Molekuly (proteiny), které jsou podstatně větší, než je průměr pórů, zůstávají uvnitř dialyzační trubice. Malé molekuly prochází póry v membráně a difundují z prostředí s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací.

Po centrifugaci byl z centrifugační zkumavky supernatant opatrně odstraněn a sedimentační rozpuštěna v minimálním objemu PBS pufru. V sedimentu byly tedy přítomny požadované protilátky. Roztok byl poté přenesen do dialyzační trubice a dialyzován 3 dny proti PBS dialyzačnímu pufru. Roztok s čistými protilátkami byl ošetřen přídavkem azidu sodného a uskladněn při -20 °C.

3.2.3 ELISA testy

Optimalizace parametrů ELISA testu zahrnovala tyto kroky:

- 1) optimalizace množství značeného auxinu a množství protilátky
- 2) optimalizace kalibrační křivky
- 3) studium křížové reaktivity

ELISA probíhá v mikrotitračních destičkách, které obsahují 96 jamek (8 řádků a 12 sloupců). Vnitřní povrch destiček je vyroben ze speciálního plastu, který je schopen vázat protilátky a antigeny. Prvním krokem bylo navázání protilátky na ELISA desku. Deska byla nakoutována monoklonální anti – IAA protilátkou, nebo polyklonálními protilátkami: anti – oxIAA nebo anti – IAA-N, které byly rozpuštěny v pufru z hydrogenuhličitanu sodného (4,2 g NaHCO₃, 50mM, pH 9,6). Do jamky bylo celkem aplikováno 150 µl této směsi. Nakoutovaná deska byla inkubována přes noc ve 4 °C. Po uplynutí této doby byla deska vyklepnuta a 2x promyta redestilovanou vodou, aby se odstranily nenavázané protilátky a následně byla vysušena. Poté byla pomocí osmikanálové automatické pipety naplněna BSA pufr, který minimalizuje možné nespecifické interakce, v množství 200 µl na jamku. Následovala opět inkubace - 1 hodinu při 24 °C. Mezitím byly přichystány příslušné standardy IAA, IAA-Me, oxIAA nebo oxIAA-Me, které byly naředěny do TBS pufru a také příslušný enzymový konjugát (IAA-AP, IAA-N-AP, IAA-Me-N-AP nebo oxIAA-AP), který byl naředěn do BSA pufru, viz tabulka 3.

Tab. 3: Příklad ředění monoklonální protilátky a ředění konjugátu IAA-AP

číslo desky	koncentrace protilátky proti IAA	Ředění konjugátu s AP
1	7,9 mg/ml	1:1333, 1:2000, 1:332, 1:4000
2	10,5 mg/ml	1:1333, 1:2000, 1:332, 1:4000

Po 1 hodině byl BSA pufr odstraněn, deska byla opět 2x promyta redestilovanou vodou a vysušena. Deska byla naplněna TBS pufr (100 µl na jamku). Následně bylo do prvního sloupce aplikováno 50 µl roztoku příslušného standardu o koncentraci 10⁻⁵ M. Roztok v prvním sloupci byl promíchán a pomocí automatické pipety bylo postupně přeneseno 50 µl roztoku z prvního sloupce až do sloupce 11. Tímto krokem se snižovala koncentrace antigenu zleva doprava. Poté byl co nejrychleji nanesen do každé jamky, kromě jamky 12A, příslušný enzymový konjugát v množství 50 µl na

jamku. Jamka 12A sloužila jako blank pro měření absorbance. Deska byla inkubována 1 hodinu při 24 °C. Po hodině byla deska vyklepnuta, 2x promyta redestilovanou vodou a vysušena. Následně byl do každé jamky aplikován substrát - 150 µl na jamku. Jako substrát byl použit *p*-nitrofenylfosfát, v množství 1 mg *p*-nitrofenylfosfátu/1 ml hydrogenuhličitan sodného pufru. Deska byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena hydroxidem sodným (0,5 M). Deska byla přenesena do spektrofotometru, kde byla změřena intenzita žlutého zbarvení při vlnové délce 405 nm. Hodnoty B/B₀ byly vypočítány podle vztahu:

$$B/B_0 = \frac{A(B) - A(UB)}{A(B_0) - A(UB)} \times 100 (\%)$$

A(B) –absorbance standardu; *A(B₀)* absorbance za nepřítomnosti neznačeného IAA-Me; *A(UB)* absorbance za přítomnosti nadbytku neznačeného IAA-Me.

Následně byla provedena logaritmická transformace kalibrační křivky podle vzorce:

$$\text{Logit } B/B_0 = \ln [B/B_0 / (100 - B/B_0)]$$

3.2.4 Křížová reaktivita

Ke křížové reaktivitě dochází tehdy, když jedna protilátka reaguje s epitopem, který je strukturně podobný imunogenu (*Daussant a Desvaux, 2007*). Afinita protilátky pro dva epitopy může být zcela odlišná. Relativní intenzita křížové reaktivity se v současné době hodnotí pomocí ELISA testu. Křížovou reaktivitu můžeme pozorovat u monoklonálních protilátek (specifické pro jeden epitop), nebo u polyklonálních protilátek (protilátky přítomny v séru jsou specifické pro různé epitopy). V posledním případě může být křížová reaktivita uskutečněna jednou nebo několika protilátkami, které jsou v séru obsaženy.

Pomocí ELISA testu bylo otestováno 37 auxinových derivátů (viz tabulka 5). Byly použity pouze monoklonální protilátky anti – IAA a konjugát IAA-AP. Na každou desku byl do řad AB nanesen standard IAA-Me. Tato látka má křížovou reaktivitu 100 %. Do 6 zbývajících řad byly vždy ve 2 opakováních nanесeny další 3 zkoumané látky. Všechny standardy byly nanášeny v koncentraci 10⁻⁵ M. Praktické provedení ELISA

testu bylo stejné jako při optimalizacích. Křížová reaktivita byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$\text{Křížová reaktivita} = \frac{\text{koncentrace standardu při B/B}_0}{\text{koncentrace křížově reagujících látek při B/B}_0}$$

3.2.5 Příprava média a vertikálních desek

Pro přípravu kultivačního média bylo naváženo 1,1 g Murashige & Skoog média (MS) a 5 g sacharózy. Látky byly rozpuštěny v redestilované vodě a pomocí 0,1 M hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 5,7 a objem roztoku doplněn na 0,5 l. Poté bylo do Erlenmayerovy baňky naváženo 3,5 g fytoagaru a zalito připraveným roztokem MS a sacharózy. Baňka byla důkladně překryta alobalem a označena páskou pro kontrolu sterilizace. Médium bylo auktoklávováno, stejně jako špičky, filtrační papír ve skleněné Petriho misce, párátka, pinzeta a destilovaná voda. Sterilní médium bylo ve flowboxu rozlito do 10 kultivačních desek.

3.2.6 Sterilizace semínek před výsevem

Semínka byla odsypána do mikrozkmavky a byl k nim přidán 1 ml sterilizačního roztoku (70% ethanol (v/v), 0,1% Tween 20). Mikrozkmavka byla míchána 10 minut při 4 °C, poté byl ve flowboxu opatrně odstraněn sterilizační roztok. Následně byla semínka v mikrozkmavce ještě protřepána s 1 ml 96% ethanolu (v/v). Zbytek ethanolu byl sterilní špičkou odstraněn.

3.2.7 Výsev

Semínka řeřichy seté (*Lepidium sativum*) a šalvěje hispánské (*Salvia hispanica*) byly zasazeny ve 2 řadách asi po 20 kusech. Semínka huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* L., COL-0) byla zasazena také po 20 kusech, ale ve 3 řadách (viz obrázek 6). Po nasazení semínek byly desky zavřeny a přetáhnuty páskou Softpore. Následně byly zabaleny do alobalu, poté do černého sáčku a uloženy na 48 hodin do lednice.

Po uplynutí této doby byly desky přeneseny do fytotronu, kde byly uloženy vertikálně do stojanů. Teplota v klima boxu byla 22 °C a světelný režim byl 16 h světlo / 8 h tma.



Obr. 6: Dvoutýdenní rostlinky huseníčku rolního

3.2.8 Extrakce vzorků pro analýzu IAA

Vzorky jednotlivých rostlin byly homogenizovány pod tekutým dusíkem a rozváženy asi po 20 mg do mikrozkupek, následně byly vzorky uchovány při teplotě – 70 °C. Ke každému vzorku bylo přidáno 990 μ l extrakčního pufru (50 mM fosfátový pufr, pH 7,0, 0,1% DEDTCA – diethyldithiokarbamová kyselina), 10 μ l směsi interních standardů (5 pmol) a 3 homogenizační kuličky. Vzorky byly homogenizovány pomocí kulového mlýnku při frekvenci 20 Hz. Následně byly vzorky extrahovány na kolotoči při 4 °C po dobu 15 minut a centrifugovány (15 minut při 17 000 rpm, 4 °C). Vzorky byly přeneseny do čisté mikrozkupek a okyseleny přidáním 45 μ l 1 M kyseliny chlorovodíkové na pH 2,7.

3.2.9 Extrakce na pevné fázi

Pro extrakci na pevné fázi (SPE) byly použity kolony C8, 500 mg (Agilent Technologies). Kolony byly připraveny tak, že byly promyty 2 ml 100% methanolu a následně 2 ml 1% kyseliny mravenčí (v/v). Poté byly vzorky nanесeny na kolony a po jejich prokapání byly kolony promyty 2 ml 10% methanolu (v/v) okyseleného 1% kyselinou mravenčí (v/v). Eluce proběhla pomocí 2 ml 70% methanolu (v/v) okyseleného 1% kyselinou mravenčí (v/v). Vzorky byly odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce.

3.2.10 Methylace

Před imunoafinitní chromatografií bylo nutné vzorky ošetřit methylací, jelikož methyl estery vykazují lepší křížové reaktivity než volné kyseliny. Odpařené vzorky byly rozpuštěny ve 100 μ l methanolu okyseleného kyselinou chlorovodíkovou (1%, v/v). Poté k nim bylo přidáno 300 μ l diazomethanu, směs byla promíchána a nechána reagovat 10 minut, poté byla opět promíchána. Vzorky byly odpařeny do sucha na TurboVap dusíkové odparce.

3.2.11 Příprava imunoafinitního gelu

Pro přípravu imunoafinitního gelu byl použit afinitní gel Affigel 10 (BioRad). Na 1 ml tohoto gelu mohlo být maximálně navázáno 25 mg IgG. Blokovací látkou byl 1 M ethanolamin hydrochlorid, pH 8. Vyizolovaná protilátka byla dialyzována přes noc proti MOPS pufru (20,93 g MOPS; 17,53 g NaCl; pH 7,2) při teplotě 4 °C. Do čisté kolonky byly pomocí Pasteurovy pipety přeneseny 3 ml gelu. Isopropanol byl nechán vykapat zpět do zásobní lahvičky. Připravený gel byl promyt 10 ml redestilované vody a 15 ml MOPSu. Následně byl přenesen do plastové zkumavky a smíchán s roztokem protilátky (25 mg/ml gelu). Reakční směs byla míchána 4 hodiny při 4 °C. Po uplynutí této doby byla zablokována nadbytečná vazebná místa přidáním 300 μ l 1 M ethanolamin hydrochloridu a směs byla míchána ještě další hodinu při 4 °C. Dále byl gel přenesen do kolony s fritou, promyt 10 ml vody a 15 ml PBS. Takto připravený gel byl uchováván v PBS pufru s přísávkem azidu sodného při teplotě 4 °C.

3.2.12 Imunoafinitní chromatografie

Stanovení kapacity a návratnosti gelu

Imunoafinitní gel byl po 500 μ l rozpipetován do kolonek s fritou o objemu 3 ml a zregenerován následujícím způsobem: 3 ml PBS, 3 ml destilované vody, 3 ml methanolu, 3 ml destilované vody a 3 ml PBS. Standard IAA-Me byl nanesen na kolony v koncentracích 100 pmol, 200 pmol, 500 pmol, 1000 pmol, 2500 pmol a 5000 pmol a jímán do téže zkumavky. Pro zvýšení výtěžnosti byl celý proces 7x opakován. Požadovaný analyt se navázal na imunoafinitní gel a nečistoty byly z kolonky odmyty pomocí 9 ml destilované vody. Eluce analytu proběhla přidáním 3 ml vychlazeného 100% methanolu. Vzorky byly jímány do čisté zkumavky a odpařeny do sucha na TurboVap dusíkové odparce.

Měření reálných vzorků

Vzorky byly rozpuštěny v 970 μ l PBS a ve 30 μ l 100% methanolu a byly umístěny na 3 minuty do ultrazvuku. Následně byly nanesený na kolony, postup byl totožný jako při stanovení kapacity a návratnosti gelu. Obsah auxinů byl stanoven pomocí UHPLC-MS/MS metody rutinně používané v Laboratoři růstových regulátorů.

4 Výsledky

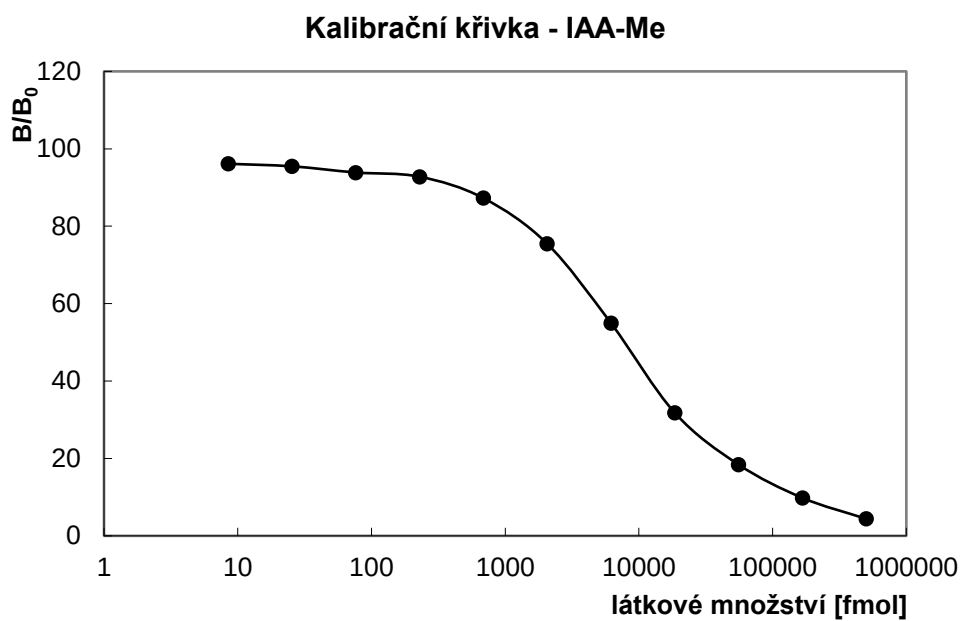
4.1 Příprava protilátek

Polyklonální protilátky proti auxinům a jejich konjugátům byly získány imunizací králíka. Králíkům bylo odebráno krevní sérum, protilátky byly vysráženy síranem amonným, centrifugovány, rozpuštěny v PBS a dialyzovány proti PBS pufru. Jejich koncentrace byla změřena na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm. Koncentrace anti – IAA-N protilátky (konjugované přes dusík) byla 24,5 mg/ml, koncentrace anti – oxIAA protilátky byla 18,2 mg/ml. Enzymovou imunoanalýzou bylo prokázáno, že polyklonální protilátky neváží daný antigen, proto byly všechny další experimenty prováděny na protilátkách monoklonálních. Monoklonální protilátka anti – IAA byla získána hybridomovou technologií (*Köhler a Milstein, 1975*), pokusné myši byly imunizovány konjugátem IAA spojeným přes karboxylovou skupinu s hovězím sérovým albuminem (IAA-C1'-BSA). Protilátky byly vysráženy ze zápalové břišní tekutiny myši a zpracovány stejným způsobem jako polyklonální protilátky, jejich koncentrace byla 12,6 mg/ml.

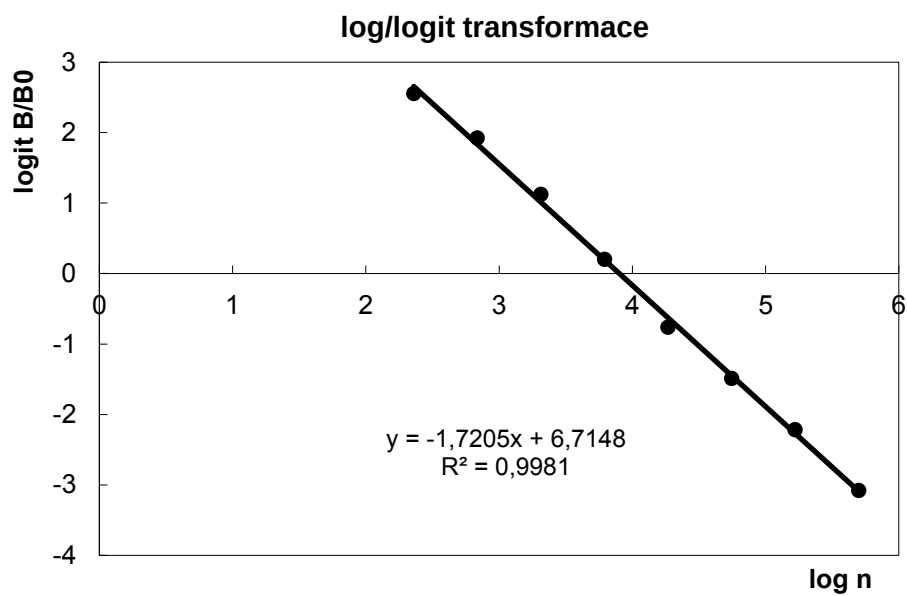
4.2 Základní parametry ELISA testu

V grafu 1 je zobrazena kalibrační křivka ELISA testu po optimalizaci jednotlivých parametrů. V grafu sledujeme závislost B/B_0 na látkovém množství standardu IAA-Me [fmol]. Hodnota B je absorbance standardu, který se navázal na danou protilátku při kompetici se značeným antigenem. Hodnota B_0 je poté absorbance v nepřítomnosti neznačeného auxinu. Kalibrační křivka byla následně logaritmicky transformována pomocí vzorce (graf 2):

$$\text{logit } B/B_0 = \ln[B/B_0 : (100 - B/B_0)]$$



Graf 1: Kalibrační křivka ELISA testu pro IAA-Me



Graf 2: Logaritmicky transformovaná kalibrační křivka ELISA testu pro IAA-Me

Tab. 4: Základní parametry ELISA testu pro stanovení IAA-Me

Charakteristiky	MAB proti IAA
Koncentrace protilátky	7,89 µg/ml
Množství značeného antigenu	25,00 ng
Lineární rozsah měření	$4,57 \cdot 10^{-9} - 1,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l
Detekční limit	$4,57 \cdot 10^{-9}$ mol/l
Hodnota polovičního vytěsnění (B/B_0)	$1,50 \cdot 10^{-7}$ mol/l
Nespecifická vazba	0,90 %
Variabilita testu	1,37 %
Variabilita mezi testy	1,10 %

Objem protilátky, který byl na desku nanesen, je 8 µl. Tento objem byl přenesen do 15 ml koutovacího roztoku a výsledná koncentrace protilátky byla 7,89 µg/ml. Pro dosažení optimálních hodnot ELISA testu byla potřebná koncentrace konjugátu IAA-AP 25 ng na jamku. Za těchto podmínek byla nespecifická vazba 0,90 % z vázané aktivity enzymového konjugátu.

Tvar kalibrační křivky udává rozsah koncentrací použitelných pro daný test. Pro přesné určení rozsahu měření byla kalibrační křivka linearizována pomocí log-logit transformace ($4,57 \cdot 10^{-9} - 1,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

K určení citlivosti dané imunoanalýzy se nejčastěji používá detekční limit. To je nejnižší množství analytu ve vzorku, jehož odezva je statisticky významná od blanku. Detekční limit ELISA testu byl $4,57 \cdot 10^{-9}$ mol/l.

Hodnota polovičního vytěsnění (B/B_0) byla vyhodnocena ze sklonu kalibrační křivky ($1,50 \cdot 10^{-7}$ mol/l), tento parametr je závislý pouze na sklonu kalibrační křivky a nezahrnuje experimentální rozptyl a je vhodný ke sledování stability ELISA testu. Variabilita uvnitř ELISA testu byla 1,37 %. Tuto hodnotu lze definovat jako shodu výsledků série měření téhož vzorku zpracovaných souběžně za stejných podmínek a vyjadřuje se jako variační koeficient. Variabilita mezi testy (1,1 %) je vyjádřena rovněž pomocí variačního koeficientu a je vypočítána na základě měření téhož standardu v několika různých pokusech.

4.3 Specifita protilátek

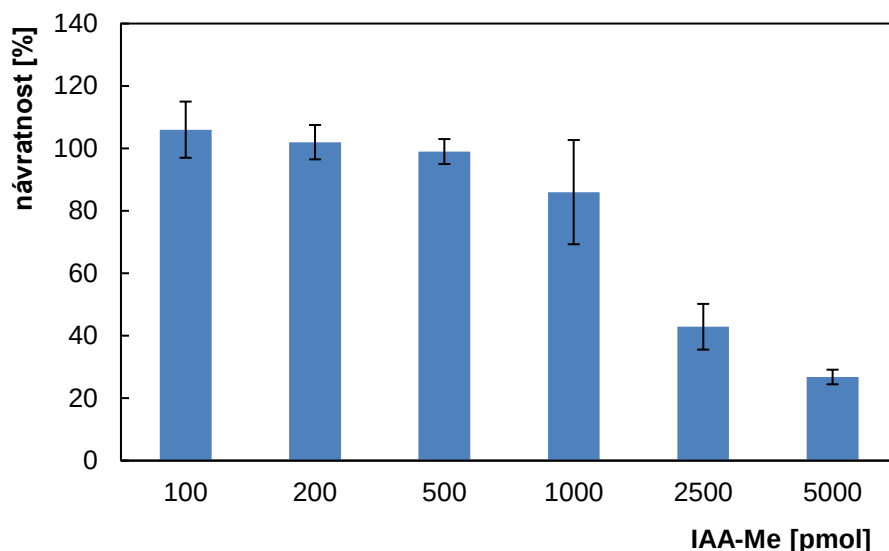
V mé bakalářské práci bylo pro zjištění křížové reaktivity různých derivátů auxinů využito enzymové imunoanalýzy. Testovala jsem celkem 37 derivátů auxinu, které vykazovaly větší či menší křížovou reaktivitu, tedy afinitu k dané protilátce. Všechny získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Nejvyšší křížovou reaktivitu, kromě standardu IAA-Me (100 %), má IAA-Et (305 %). Vysokých hodnot dosahuje také IAA-Gly (91,60 %) a IAAla-Me (57,80 %). Velká část testovaných hormonů dosahuje nízkých hodnot, a to <0,01 %. Tyto hormony mají velmi malou (nebo téměř žádnou) afinitu k protilátce.

Tab. 5: Přehled auxinů s hodnotami křížové reaktivity

Zkratka	Název	Křížová reaktivita [%]
IAA-Me	Methyl ester kyseliny indol-3-octové	100,00
IAA-Et	Ethyl ester kyseliny indol-3-octové	305,00
IAA	Indol-3-octová kyselina	0,79
IAM	Indol-3-acetamid	22,00
IAN	Indol-3-acetonitril	4,79
IEt	Indol-3-ethanol	<0,01
IM	Indol-3-methanol	6,85
IAld	Indol-3-aldehyd	0,20
I3CA	Indol-3-karboxylová kyselina	<0,01
IPA	Indol-3-propionová kyselina	<0,01
IBA	Indol-3-máselná kyselina	<0,01
OxIAA	2-Oxindol-3-octová kyselina	<0,01
4ClIAA	4-Chlorindol-3-octová kyselina	<0,01
TRP	Tryptofan	<0,01
TRY	Tryptamin	<0,01
IAAla	Indol-3-acetyl-L-alanin	3,40
IAVal	Indol-3-acetyl-L-valin	<0,01
IAA-Gly	Indol-3-acetyl-L-glycin	91,60
IAA-Leu	Indol-3-acetyl-L-leucin	<0,01
IAA-Asp	Indol-3-acetyl-L-aspartát	2,73
IAA-Phe	Indol-3-acetyl-L-fenylalanin	0,03
IA-Ileu	Indol-3-acetyl-L-isoleucin	<0,01
IA-Glu	Indol-3-acetyl-L-glutamová kyselina	2,45
IAAla-Me	Methyl ester indol-3-acetyl-L-alaninu	57,80
IAAsp-Me ₂	Dimethyl ester indol-3-acetyl-L-asparagové kyseliny	6,15
IAGlu-Me ₂	Dimethyl ester indol-3-acetyl-L-glutamové kyseliny	9,23
IAGly-Me	Methyl ester indol-3-acetyl-glycinu	<0,01
IAIle-Me	Methyl ester indol-3-acetyl-L-isoleucinu	2,69
IALeu-Me	Methyl ester indol-3-acetyl-L-leucinu	<0,01
IaPhe-Me	Methyl ester indol-3-acetyl-L-fenylalaninu	<0,01
I3CA-Me	Methyl ester indol-3-karboxylové kyseliny	<0,01
4ClIAA-Me	Methyl ester 4-chlorindol-3-octové kyseliny	13,00
IGA-Me	Methyl ester indol-3-glyoxylové kyseliny	<0,01
Trp-Me	Methyl ester tryptofanu	<0,01
oxIAA-Me	Methyl ester 2-oxindol-3-acetylu	<0,01
IBA-Me	Methyl ester indol-3-máselné kyseliny	3,10
IPA-Me	Methyl ester indol-3-pyrohroznové kyseliny	0,12

4.4 Kapacita imunoafinitního gelu

Monoklonální protilátky proti IAA-Me byly navázány na imunoafinitní gel. Jeho kapacita pro IAA-Me je $3,3 \pm 0,2$ nmol na 1 ml. Závislost návratnosti gelu na látkovém množství IAA-Me je zobrazena v grafu 3.



Graf 3: Závislost návratnosti imunoafinitního gelu na látkovém množství IAA-Me

4.5 Výsledky měření reálných vzorků

Byly stanoveny hladiny IAA a jejích konjugátů s aminokyselinami ve třech testovaných rostlinách – huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L., COL-0), řeřicha setá (*Lepidium sativum*) a šalvěj hispánská (*Salvia hispanica*). Rostliny byly pěstovány na vertikálních deskách ve fytotronu a extrahovány pro analýzu auxinů. Požadované množství navážené čerstvé hmoty bylo kolem 20 mg a měření bylo provedeno pomocí UHPLC-MS/MS analýzy. Z naměřených hodnot vyplývá, že 3 testované rostliny obsahují nejvíce IAA. V rostlinách jsou také v menším množství zastoupeny konjugáty IAA s aminokyselinami Asp, Glu, Gly a Leu. Mimo mez detekce se u všech zkoumaných rostlin nachází IAAIa, IAPhe a IAVaI.

Tab. 6: Hladiny auxinů v reálných vzorcích, IAA_{la}, IAPhe, IAV_{al} - <LOD (limit detekce)

	[pmol/g] čerstvé hmoty				
	IAA	IAAsp	IALeu	IAGlu	IAGly
Huseníček rolní	200,5 ± 10,6	34,9 ± 2,0	0,43 ± 0,15	17,7 ± 2,1	0,09 ± 0,02
Řeřicha setá	145,6 ± 12,5	16,6 ± 1,1	<LOD	8,6 ± 1,3	<LOD
Šalvěj hispánská	29,7 ± 3,4	39,4 ± 4,6	<LOD	13,4 ± 2,5	<LOD

5 Diskuze

Cílem této práce bylo charakterizovat 3 typy protilátek proti auxinům. Byly testovány dvě polyklonální protilátky – anti – IAA-N a anti – oxIAA, které byly získány imunizací králíka. ELISA testy bylo zjištěno, že nemohou být použity pro další experimenty – jejich afinita k příslušnému antigenu byla velmi nízká. Proto byla otestována monoklonální protilátka, která se ukázala jako vhodná a byla použita pro izolaci endogenních auxinů. Konjugát monoklonální protilátky byl vytvořen spojením IAA s hovězím sérovým albuminem (BSA) přes karboxylovou skupinu (IAA-C1'-BSA). Tento postup popsal již dříve *Weiler (1981)*.

Křížovou reaktivitou byla určena specifita monoklonální protilátky. Tomuto testu bylo podrobena 37 derivátů auxinů. Dle předpokladu měla vyjít nejvyšší hodnota křížové reaktivity u strukturně nejpodobnějších látek. Tento předpoklad se potvrdil, kromě standardu IAA-Me (100 %) měl vysokou hodnotu křížové reaktivity IAA-Et (305 %). Nízkou hodnotu měla naopak volná IAA (0,79 %). Rozsáhlé studie anti-IAA protilátek potvrzují jejich polyspecifitu. *Pěňčík et al. (2009)* testovali polyklonální protilátky proti IAA a křížová reaktivita 3-substituovaných indolů (zahrnující indol-3-acetamid, indol-3-acetonitril, indol-3-ethanol a methyl estery IAA konjugátů) se pohybovala mezi 85 % až 210 %, v porovnání s IAA-Me.

Byly vypěstovány 3 druhy rostlin – huseníček rolní, řeřicha setá a šalvěj hispánská. Vzorky byly podrobeny extrakci na pevné fázi (SPE). *Rolčík et al. (2005)* se zabývali purifikací indol-3-octové kyseliny pomocí SPE, jakožto vhodný krok pro extrakci a odstranění nadbytečné matrice ze vzorku. Postup je založen na použití kolon C18, celková návratnost byla určena mezi 89–94 %. Směs monoklonálních protilátek s vysokou afinitou vůči auxinům byla použita pro přípravu imunoafinitního gelu, jeho kapacita pro IAA-Me byla $3,3 \pm 0,2$ nmol na 1 ml. Pomocí imunoafinitní chromatografie byly získány auxiny, které byly dále kvantifikovány. Směs obsahující IAA a její konjugáty byla označena interními standardy (připraveny dle *Ilić et al., 1997*), které odpovídaly studovaným sloučeninám. Standardy obsahovaly indolový skelet označený pěti atomy deuteria, atomem ^{15}N nebo ^{13}C . Sloučeniny byly kvantifikovány pomocí selektivní UHPLC – MS/MS analýzy. U všech tří testovaných rostlin bylo nalezeno největší množství IAA, IAAsp a IAGlu. V rostlinách se ale nacházely v mnohem menším množství, než popsal *Pěňčík et al. (2009)* u testované rostliny čemeřice černé (*Helleborus niger*). U této rostliny nově detekovali IAA konjugáty se třemi aminokyselinami – Gly, Val a Phe. V experimentální části této bakalářské práce byl IAVAl a IAPhe mimo mez detekce, IAGly byl v nepatrném

množství detekován pouze u huseníčku rolního. *Kowalczyk a Sandberg (2001)* již dříve analyzovali hladiny konjugátů IAA s Asp, Glu a jednoho oxidativního katabolitu (oxIAA) v huseníčku a potvrdili existenci dvou dalších konjugátů – IAAla a IALeu, které se v rostlině vyskytují jen velmi malém množství a nepřispívají ke zvýšení celkového objemu IAA. V této práci byl detekován IALeu v nepatrném množství, IAAla detekován nebyl. *Matsuda et al. (2005)* kvantifikovali kyselinu indol-3-octovou (IAA) a její konjugáty v rýži seté (*Oryza sativa*). V rostlině byla dle předpokladu nejvíce zastoupena IAA, a to ve všech částech rostliny včetně semen. Mimo to byly v kořeni, kalusu a semenech detekovány tři typy konjugátů – IAAsp, IAGlu, IAAla. V této bakalářské práci se IAA, IAAsp a IAGlu vyskytovali u všech testovaných rostlin ve větším množství než v rýži.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat protilátky proti auxinům a na jejich základě připravit gel pro imunoafinitní chromatografii. Testování bylo provedeno pomocí enzymové imunoanalýzy. Polyklonální protilátky byly získány z králíčího séra a vysráženy síranem amonným, koncentrace protilátky anti – IAA-N byla 24,5 mg/ml a anti – oxIAA 18,2 mg/ml. Bylo zjištěno, že tyto protilátky vykazovaly velmi špatnou afinitu k imunogenu, a proto byla v dalších experimentech použita monoklonální protilátka získána hybridomovou technologií. Studium křížové reaktivity byla určena specifita monoklonální protilátky, nejvyšších hodnot dosahovaly IAA-Et (305 %) a IAA-Gly (91,60 %), v porovnání se standardem IAA-Me (100 %).

Po charakterizaci byla monoklonální protilátka navázána na imunoafinitní gel, jehož kapacita pro IAA-Me byla stanovena na $3,3 \pm 0,2$ nmol na 1 ml. Pomocí imunoafinitní chromatografie byly vyizolovány auxiny z rostlinného materiálu, které byly následně kvantifikovány pomocí UHPLC-MS/MS. Bylo zjištěno, že v největším množství se u testovaných rostlin nachází IAA, dále IAAsp a IAGlu. Konjugáty IAA s Ala, Val a Phe nebyly detekovány.

7 Seznam literatury

Ayyar B., Arora S., Murphy C., O'Kennedy R. (2011). Affinity chromatography as a tool for antibody purification, *Methods* **56**, 116-129.

Berg JM., Tymoczko JL., Gatto GJ. (2012). *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, USA, 69.

Daussant J., Desvaux FX. (2007). Introduction to immunochemical techniques for medical diagnosis, food quality control and environmental testing, Institute of chemical technology Prague, Praha, Česká republika, 15.

Delaunay N., Pichon V., Hennion M. (2000). Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices, *Journal of Chromatography B* **745**, 15-37.

Enders TA., Strader LC. (2015). Auxin activity: past, present, and future, *American Journal of Botany* **102**, 180-196.

Evans ML., Hokanson R. (1969). Timing of the response of coleoptiles to the application and withdrawal of various auxins, *Planta* **85**, 85-95.

Ferenčík M. (1989). *Imunochémia*, Alfa, Bratislava, Slovensko.

Goldsmith MH. (1977). The polar transport of auxin, *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 439-478.

Grodzki AC, Berenstein E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration, *Methods in Molecular Biology* **588**, 15-26.

Hollis CA., Tepper HB. (1971). Auxin transport within intact dormant and active white ash shoots, *Plant Physiology* **48**, 146-149.

Hořejší V., Bartůňková J. (2009). *Základy imunologie*, 4. Vydání, Triton, Praha, Česká republika, 64.

Huse K., Böhme H., Scholz G. (2002). Purification of antibodies by affinity chromatography, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **51**, 220.

Ilić N., Magnus V., Östin A., Sandberg G. (1997). Stable-isotope labeled metabolites of the phytohormone, indole-3-acetic acid, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **39**, 433-440.

Jones PT., Dear PH., Foote J., Neuberger MS., Winter G. (1986). Replacing the complementary-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* **321**, 522-525.

Köhler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* **256**, 495–497.

Kopecký O., Andrýs C., Budayová E., Drahošová M., Havlasová J., Krejsek J., Lukešová Š., Vokurková D. (2004). Laboratorní vyšetření v klinické imunologii a alergologii, Garamon s.r.o., Hradec Králové, Česká republika, 63-67.

Kowalczyk M., Sandberg G. (2001). Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* **127**, 1845-1853.

Krejsek J., Kopecký O. (2004). Klinická imunologie, Nucleus HK, Hradec Králové, Česká republika, 802.

Litzman J., Freiburger T., Král V., Thon V. (2007). Základy vyšetření v klinické imunologii, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 22.

Ljung K., Östin A., Lioussanne L., Sandberg G. (2001). Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in scots pine seedlings, *Plant Physiology* **125**, 464-475.

Ljung K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development, *Development* **140**, 943-950.

Lonberg N., Taylor LD., Harding FA., Trounstine M., Higgins KM., Schramm SR., Kuo CC., Mashayekh R., Wymore K., McCabe JG., Munoz-O'Regan D., O'Donnell SL., Lapachet ESG., Bengoechea T., Fischwild DM., Carmack CE., Kay RM., Huszar D. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications, *Nature* **368**, 856-859.

Lukáš Z., Dráberová E., Feit J., Vojtěšek B. (1997). Imunohistochemické metody v biologii a biotické diagnostice, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika, 9-12.

Matsuda F., Miyazawa H., Wakasa K., Miyagawa H. (2005). Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**, 778-783.

McCafferty J., Griffiths AD., Winter G., Chiswell DJ. (1990). Phage Antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature* **348**, 552-554.

Morgan PW., Durham JI. (1972). Abscission: Potentiating action of auxin transport inhibitors, *Plant Physiology* **50**, 313-318.

Morrison SL., Johnson MJ., Herzenberg LA., Oi VT. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **81**, 6851-6855.

Murphy K. (2012). Janeway's immunobiology, Garland Science, New York, USA, 723-725.

Nishimura T., Nakano H., Hyashi K., Niwa Ch., Koshiba T. (2009). Differential downward stream of auxin synthesized at the tip has a key role in gravitropic curvature via TIR1/AFBs-mediated auxin signaling pathways, *Plant and Cell Physiology* **50**, 1874–1885.

Normanly J., Cohen JD., Fink GR. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 10355-10359.

Nomanly J. (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **10**, 1-17.

Peakman M., Vergani D. (2009). Basic and clinical immunology, second edition, Churchill Livingstone, London.

Pěňčík A., Rolčík J., Novák O., Magnus V., Barták P., Buchtík R., Salopek-Sondi B., Strnad M. (2009). Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction, *Talanta* **80**, 651-655.

Phillips IDJ. (1975). Apical dominance, *Annual Review of Plant Physiology* **26**, 341-367.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998). *Fyziologie rostlin*, Academia, Praha, Česká republika, 243–252.

Roitt I. (1981). *Základy imunológie*, Osveta, Martin, Slovensko, 33-38.

Rolčák J., Řečinská J., Barták P., Strnad M., Prinsen E. (2005). Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction, *Journal of Separation Science* **28**, 1370-1374.

Shen-Miller I., Cooper P., Gordon SA. (1969). Phototropism and photoinhibition of basipolar transport of auxin in oat coleoptiles, *Plant Physiology* **44**, 491-496.

Stites DP., Terr AI. (1994) *Základní a klinická imunologie*, Victoria Publishing, a.s., Praha, Česká republika, 104-114.

Subramanian A. (2002). *Immunoaffinity Chromatography*, Humana press Inc., Molecular biotechnology, 41-47.

Taiz L., Zeiger E. (2010). *Plant physiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, USA, 546-575.

Tivendale ND., Ross JJ., Cohen JD. (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis, *Trends in plant science* **19**, 44-51.

Viklický O., Janoušek L., Baláž P. (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi*, Grada, Praha, Česká republika, 239.

Vrána A., Fellnerová I., Vránová J. (2011). *Imunologie a imunomodulační terapie*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika, 40.

Wang B., Chu J., Yu T., Xu Q., Sun X., Yuan J., Xiong G., Wang G., Wang Y., Li J. (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **112**, 4821-4826.

Weiler EW. (1981). *Planta* **153**, 319.

Went FW. (1928). Wuchsstoff und Wachstum, *Extrait du Recueil des Travaux Botaniques Neerlandais* **25**, 1-116.

Woodward AW., Bartel B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction, *Annals of Botany* **95**, 707–735.