



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Imunomagnetická mikroextrakcia brassinosteroidov

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: Ivana Želikovská
Študijný program: B1501 Experimentálna biológia
Študijný obor: Experimentálna biológia
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúci práce: Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Termín odovzdania práce: 2018

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Ivana Želikovská
Názov práce	Imunomagnetická mikroextrakcia brassinosteroidov
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratoľ rústových regulátorů
Vedúci práce	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Bakalárska práca sa zaoberá izoláciou a purifikáciou rastlinných hormónov brassinosteroidov z rastlinného materiálu. Hlavným cieľom práce bolo vyvinúť novú metódu pre izoláciu týchto látok založenú na imunomagnetickej purifikácii. Princípom tejto metódy bolo naviazanie špecifickej monoklonálnej protilátky proti brassinosteroidom na magnetické mikročastice. Pomocou štandardov brassinosteroidov bola stanovená návratnosť purifikačného procesu a následne bola táto metóda použitá k izolácii endogénnych brassinosteroidov z kvetu repky a hrachu siateho.</p>
Kľúčové slová	Brassinosteroidy, protilátky, imunomagnetické častice, purifikácia
Počet strán	38
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Ivana Želikovská
Title of thesis	Immunomagnetic microextraction of brassinosteroids
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Bachelor thesis deals with the isolation and purification of plant hormones of brassinosteroids from plant material. The main objective of the work was to develop a new method for the isolation of these substances based on immunomagnetic purification. The principle of this method was to bind a specific monoclonal antibody against brassinosteroid to magnetic microparticles. The return of the purification process was determined using the brassinosteroid standards, and the method was then used to isolate endogenous brassinosteroids from rape and pea.</p>
Keywords	Brassinosteroids, antibody, immunomagnetic particles, purification
Number of pages	38
Number of appendices	0
Language	Slovak

Prehlasujem, že predloženú bakalársku prácu som vypracovala samostatne za použitej citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

podpis:

Moje poďakovanie patrí mojej vedúcej práci Mgr. Jane Oklešťkovej, PhD., za jej čas, poskytnutie vedomostí, priateľský prístup a odborné jednanie.

Ďalej moje poďakovanie patrí doc. Ondrejovi Novákovi, PhD. za UHPLC-MS/MS analýzu a Mgr. Kristýne Pospíškovej, PhD. za poskytnutie magnetických častíc. V neposlednom rade, ďakujem mojej rodine za psychickú podporu.

Zoznam použitých skratiek

ABA	kyselina abscisová
BAK1	BR1- ASSOCIATED KINASE-1
BES1	BR- INSENSITIVE- EMS- SUPPRESSOR-1
BIN2	BRASSINOSTEROID INTENSIVE-2
BL	brassinolid
BR1	BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE-1
BRK11	BRI1-KINASE-INHIBITOR
BRL1	BRASSINOSTEROID INTENSIVE -1 LIKE-1
BRL3	BRASSINOSTEROID INTENSIVE-1 LIKE-3
BRs	Brassinosteroidy
BZR1	BRASSIAZOLE - RESISTANT-1
CI	chemická ionizácia
CKs	cytokiníny
CN	nitrilová skupina
CS	kastasteron
DL/SPE	dvojitá vrstva extrakcie v tuhej fáze
EI	elektrónová ionizácia
24-epiBL	24-epibrassinolid
24-epiCS	24-epikastasteron
ET	etylén
GAs	giberelíny
GC	plynová chromatografia
GC-MS	plynová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou
HCS	28-homokastasteron
HPLC	vysokovýkonná kvapalinová chromatografia
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAC	imunoafinitná chromatografia

IAE	imunoafinitná extrakcia
ISD	derivatizácia in-situ
LC-MS	kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou
MF	mobilná fáza
MIAC	magnetická imunoafinitná chromatografia
NH ₂	aminoskupina
norCS	nor-kastasteron
R _f	retenčný faktor
RLK	na leucin bohatá kináza
RuBisCO	ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxylaza
SF	stacionárna fáza
SPE	extrakcia na tuhej fáze
SPE	extrakcia na tuhej fáze
TLC	chromatografia na tenkej vrstve
TY	typhasterol
UHPLC-MS/MS	vysokovýkonná kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou

Obsah

1. Úvod a ciele práce.....	9
2. Teoretický úvod	10
2.1 Fytohormóny	10
2.1.1 Všeobecná charakteristika.....	10
2.1.2 Charakteristika brassinosteroidov	10
2.1.3 Chemická štruktúra brassinosteroidov	11
2.1.4 Účinky pôsobenia brassinosteroidov.....	12
2.1.5 Signálna dráha brassinosteroidov	13
2.1.6 Transport brassinosteroidov	14
2.1.7 Analytické stanovenie brassinosteroidov	15
3. Materiál a metodika.....	21
3.1 Rastlinný materiál	21
3.2 Prístrojové vybavenie.....	22
3.3 Chemikálie	22
3.3.1 Zloženie roztokov.....	23
3.4 Metódy práce.....	23
3.4.1 Príprava protilátok metódou zrážania roztokom síranu amonného	23
3.4.2 Konjugácia protilátky na magnetický nosič pomocou glutaraldehydovej metódy.....	24
3.4.3 Imunomagnetická purifikácia.....	25
3.4.4 Extrakcia endogénnych BRs z rastlinného materiálu.....	25
3.4.5 Extrakcia na tuhej fáze v kombinácii s imunoafinitnou chromatografiou.....	26
4. Výsledky a diskusia.....	27
4.1. Izolácia protilátky a príprava imunomagnetických častíc	27
4.2. Návratnosť imunomagnetickéj purifikácie.....	27
4.3. Izolácia endogénnych brassinosteroidov z rastlinného materiálu	29
5. Záver	34
6. Použitá literatúra	35

1. Úvod a ciele práce

Do skupiny fytohormónov patria brassinosteroidy, ktoré boli objavené len nedávno. Ich úlohou je kontrolovať bioaktivitu v bunke a to predlžovanie a delenie buniek, ihnbíciu rastu koreňa, diferenciáciu xylému, vývoj, reprodukciu, fotomorfogenézu a majú vplyv na vyváženie klasických fytohormónov. Brassinosteroidy je možné extrahovať z rastlinného materiálu viacerými imunochemickými metódami. Cieľom práce bolo v rámci prehĺbenia problematiky spracovať v teoretickej časti rešerš na tému brassinosteroidy a možnosti ich stanovenia v rastlinnom materiáli a v experimentálnej časti pripraviť novú metódu pre ich stanovenie založenú na imunomagnetickej purifikácii. Táto metóda bola založená na naviazaní špecifickej protilátky proti brassinosteroidom na magnetické mikročastice. U takto pripraveného imunosorbentu bola stanovená jeho kapacita a na záver bol použitý k izolácii endogénnych brassinosteroidov z rastlinného materiálu.

2. Teoretický úvod

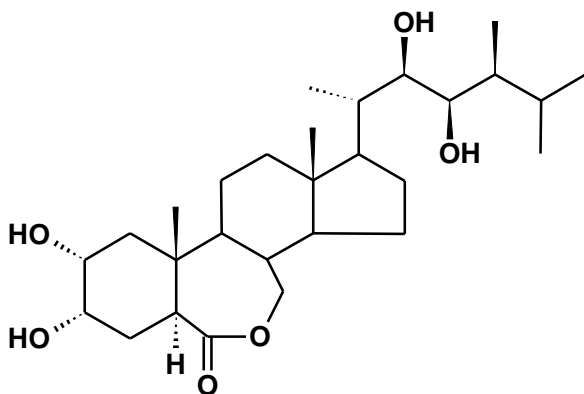
2.1 Fytohormóny

2.1.1 Všeobecná charakteristika

Fytohormóny sú špeciálne malé molekuly, ktoré sa v rastlinách vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách (pg/g čerstvej hmoty) a pritom hrajú významnú rolu v raste a vývoji rastlín. Fytohormóny sú rozdelené do rôznych skupín na základe ich štruktúry a fyziologických funkcií. Patrí sem kyselina abscisová (ABA), auxíny, gibberelíny (GAs), cytokiníny (CKs), etylén (ET), tieto rastlinné hormóny boli objavené v polovici dvadsiateho storočia pričom brassinosteroidy (BRs), jasmonáty, salicyláty a strigolatony boli objavené len nedávno.

2.1.2 Charakteristika brassinosteroidov

Brassinosteroidy (BRs) predstavujú pomerne mladú skupinu rastlinných hormónov, sú lokalizované vo vegetatívnom aj reprodukčnom tkanive a sú nevyhnutné pre rast a diferenciáciu rastlín. Po prvýkrát boli izolované z peľu repky olejnej (*Brassica napus L.*). Zlúčenina, ktorá mala najvyššiu biologickú aktivitu bola pomenovaná brassinolid (obr.1) a pomocou rentgenovej kryštalografie bolo určené, že sa jedná o polyhydroxylovanú steroidnú látku štruktúrne podobnú steroidným hormónom (Grove *et al.*, 1979).



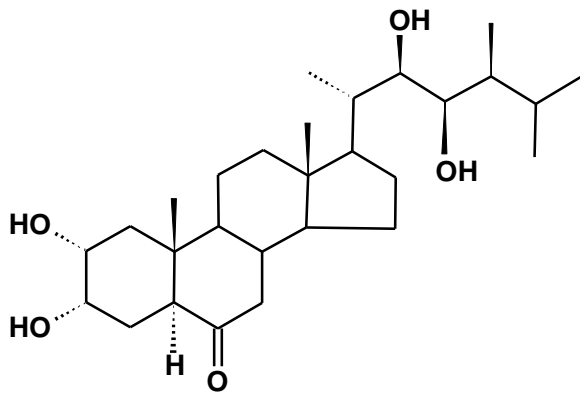
Obr. 1. Štruktúra brassinolidu (6-oxo-7 laktónovy typu brassinosteroidu).

Prvé experimenty boli zamerané hlavne na exogénnu aplikáciu BRs na rastliny a následnú rastovú reakciu. Vďaka izolácii BR- deficientných a neskôr BR- insenzitívnych mutantov *Arabidopsis thaliana* bolo objavené, že sa jedná o esenciálne endogénne rastlinné hormóny

(Clouse *et al.*, 1996). BRs kontrolujú predlžovanie a delenie buniek, inhibíciu rastu koreňa, diferenciáciu xylému, reprodukčné procesy, fotomorfogézu a majú vplyv na vyváženú úroveň ostatných fytohormónov (cytokinínov, auxínov, gibberelínov, kyseliny abscisovej a etylénu). Sú dôležité pri klíčení semien, otváraní prieduchov, kvitnutí a ovplyvňujú stavbu bunečnej steny (Kamlar, 2010). Nedávne štúdiá uviedli, že brassinosteroidy môžu zlepšiť výnos plodín a ich kvalitu ak sú pod vplyvom stresových podmienok a zmiernujú toxické účinky spôsobené ťažkými kovmi, ako napríklad hliník, niklu, olova, medi a iných (Bajguz & Hayat, 2009). Charakteristické vlastnosti brassinosteroidov nemusia byť limitované len na rastliny ale môžu byť rozšírené aj na živočíšne modely. Tieto steroidy sa ukázali ako potenciálne prospešné v medicínskych efektoch ako napríklad v neuroprotektívnom účinku, v antivírusovom efekte, v protirakovinových účinkoch, v proticholesterolových účinkoch a v anabolických a adaptogénnych efektoch (Oklešťková *et al.*, 2015)

2.1.3 Chemická štruktúra brassinosteroidov

BRs sú zložené z bočných reťazcov a z centrálného jadra tvoreného 4 nenasýtenými cyklami (A,B,C,D). Ich štruktúrne variácie pochádzajú z rôznej orientácie oxygenovaných funkcií v A a B prstenci. V závislosti na alkylovej substitúcii na dvadsiatom štvrtom uhlíku bočného reťazca môžu byť tieto steroidy klasifikované ako C-27, C-28 a C-29 typ. Na základe oxidačného stavu A a B prstenca sa prirodzené a syntetické BRs môžu rozdeliť do dvanástich rôznych typov. Napríklad ako 6-oxo, 7- laktónový typ alebo 6- ketónový typ (obr.1 a 2). Tieto charakteristiky vedú k úvahám, že sa ako prírodné brassinosteroidy považujú 3-oxygen (20 β)-5 α -cholestane-22 α ,23 α -dioly rastlinného pôvodu, ktoré nesú ďalšie alkylové alebo oxygenové substituenty. Tie sa môžu takisto objaviť v konjugácii s cukrami alebo masnými kyselinami. Niektoré z biosyntetických prekurzorov brassinosteroidov, ako je kastasteron, 6-deoxokastasteron, 3-epi-6-deoxokastasteron a 6-deoxo-28-norkastasteron, ako aj katabolity, ako je kryptolid nespĺňajú všetky štrukturálne požiadavky (Antonchick *et al.*, 2005)



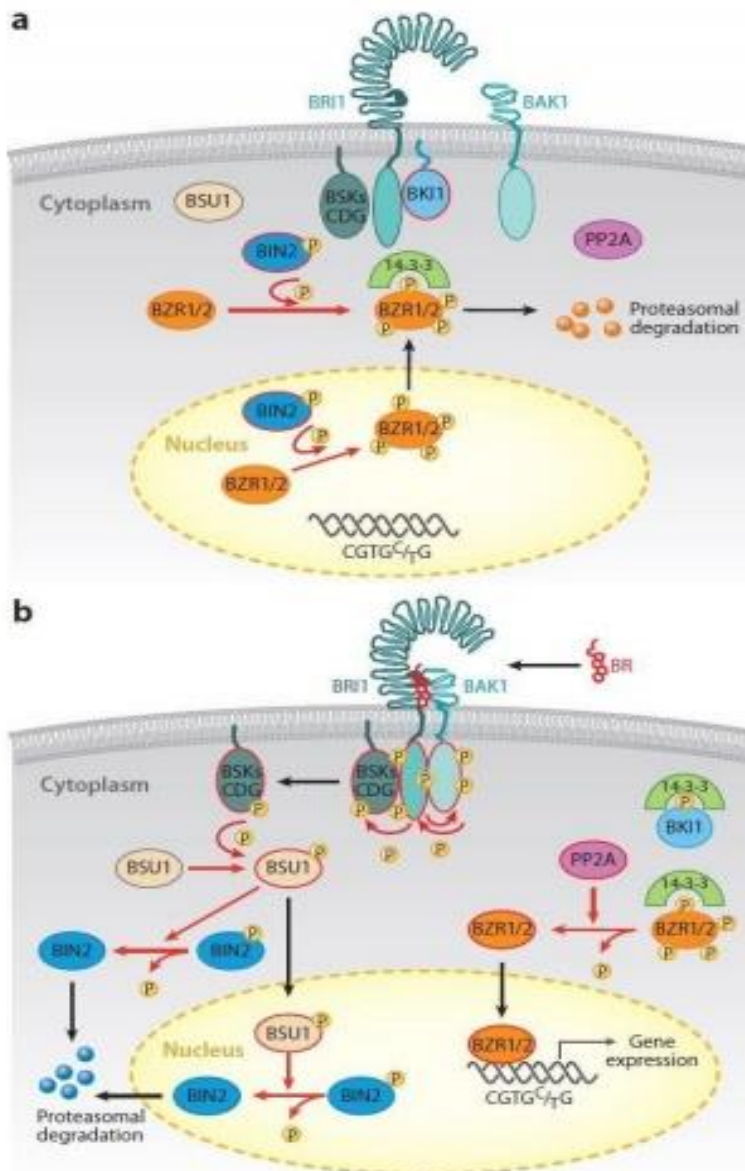
Obr. 2. Štruktúra kastasteronu (6-ketonového typu brassinosteroidu).

2.1.4 Účinky pôsobenia brassinosteroidov

Brassinosteroidy podporujú rast buniek pri ich delení a predlžovaní sa. Mikroskopickým pozorovaním listov mutantných rastlín, čiže rastlín, ktoré obsahovali nedostatočné množstvo brassinosteroidov bolo zistené, že veľkosť buniek je menšia než veľkosť buniek u bežnej rastliny (Kamlar, 2010). Predpokladá sa, že BRs sú nutné k normálnemu rastu koreňa na základe vonkajších znakov BRs- deficientných mutantov, ktorý majú redukovaný koreň. Nižšia koncentrácia BRs podporuje rast koreňa a naopak, vyššia koncentrácia inhibuje. BRs v nízkych koncentráciách s auxínami pracujú synergne, pretože oba hormóny podporujú vznik postranných koreňov. BRs vplyvajú na cievny systém rastliny a to tak, že podporujú diferenciáciu xylému a potlačujú diferenciáciu floému (Kamlar, 2010). Je to zjavné u BRs-deficientných mutantov, ktorý majú nepravidelné rozloženie cievnych zväzkov a takisto vyšší pomer floému než xylému. BRs majú pozitívny vplyv na klíčenie, pretože podporujú rast a delenie buniek a sú potrebné k prekonaní inhibičného účinku kyseliny abscisovej (Taiz *et al.*, 2006). Bolo preukázané, že nie len auxíny ale aj BRs vyvolávajú produkciu etylénu, ktorý urýchľuje starnutie pletív. Regulácia fotosyntézy je ďalšou dôležitou úlohou BRs (Arteca, 2008). Výnos fotosyntézy sa zvyšuje exogénnou aplikáciou BRs, predovšetkým 24-epibrassinolidu (24-epiBL) a tým sa zvyšuje aktivita enzýmu RuBisCO (Xia *et al.*, 2009). BRs pomáhajú rastline prežiť v nepriaznivých podmienkach (zvyšujú toleranciu voči abiotickému stresu) ako napr. pri nedostatku vody, za chladu alebo za zvýšenej teploty, poprípade v prítomnosti herbicídov (Piñol & Simón, 2010).

2.1.5 Signálna dráha brassinosteroidov

V plazmatickej membráne sa nachádza kináza (RLK), ktorá sa naviaže na ligand extracelulárnej oblasti BR- INSENTIVE-1 (BR1), BRI1- LIKE-1(BRL1) a BR- INSENSITIVE-1- LIKE-3 (BRL3) spúšťa dimerizáciu s BRI1- ASSOCIATED- KINASE - 1 (BAK1), ktorá aktivuje transfosforyláciu ich kinázových domén. Aktivácia týchto receptorov vedie ku fosforylačnej kaskáde, ktorá inaktivuje GSK3 kinázu z BR- INSENSTIVE-2 (BIN2) rodiny (obr.3). To umožní akumuláciu BRASSIAZOLE - RESISTANT-1 (BZR1) A BR- INSENSTIVE- EMS- SUPPRESSOR-1 (BES1) transkripčných faktorov v jadre, ktoré sa naviažu na promotor tisícky génov a regulujú ich transkripciu (Bekhadir & Jaillais, 2015). Komplex BRI1/BAK1 je regulovaný antagonisticky z vonkajšej aj vnútornej strany bunky (Santiago *et al.*, 2013). BR ligand sa správa ako molekulárne lepidlo a pomáha prinášať extracelulárne domény BRI1 a BAK1 v bunečnej stene. Asociácia BRI1/BAK1 je taktiež regulovaná v cytozole pomocou BRI1- KINASE-INHIBITOR(BKI1), ktorý je autonómny negatívny regulátor BRI1. BKI1 je proteín a reaguje na základe C- terminálneho peptidu, ktorý sa naviaže na BRI1 kinázovu doménu a membrána zavesí tento proteín do plazmatickej membrány. BKI1 C- terminálny chvost sa skladá z 20 peptidových zvyškov a je potrebný pre naviazanie BRI1 kinázovej domény. In vitro, C- terminálny chvost inhibuje ko-imunoprecipitáciu BAK1 pomocou BRI1 (Jaillais *et al.*, 2011). Ligand sa naviaže na extracelulárnu doménu BRI1 a spúšťa uvoľnenie BKI1 z plazmatickej membrány čo umožňuje interakciu medzi BRI1 a BAK1 kinázami a aktivuje BR signalizáciu. BKI1 je zacielená do plazmatickej membrány pomocou membránového uzla, ktorý obsahuje opakovanie dvojitých alebo dvojsýtnych zvyškov (lyzínu a/alebo arginínu). BRI1 rapídne fosforyluje BKI1 na chránenom tyrozínovom zvyšku vo svojom membránovom uzle. To spúšťa uvoľnenie BKI1 z plazmatickej membrány a dovoľuje signalizáciu BRs (Jaillais *et al.*, 2016).



Obr. 3. Signálna kaskáda BRs. (a) situácia bez prítomnosti BR, (b) situácia s prítomnosťou BR (prevzaté z Wang *et al.*, 2012).

2.1.6 Transport brassinosteroidov

Všeobecne povedané, distribúcia BRs je široká a tieto hormóny sú prítomné vo väčšine rastlinných pletív (Bajguz & Tretyn, 2003). Napriek tomu, bioaktivita BRs kastasteronu a brassinolidu sa veľmi líši v rôznych častiach rastliny a v širokom spektre rastlinných druhov. Napríklad, najvyššia úroveň bioaktívnych BRs sa všeobecne vyskytuje v reprodukčných orgánoch. Naopak, bioaktivita BRs vo vegetatívnych orgánoch je oveľa nižšia, najnižšia úroveň bioaktívnych BRs je v koreni. Najvyššia akumulácia bioaktívnych

BRs sa nachádza v mladých aktívne rastúcich častiach ako je koreňová špička a mladé internody čo nás smeruje opäť k tvrdeniu, že BRs hrajú rolu pri bunkovom delení a predlžovaní. Otázkou je či sa BRs prepravujú na vzdialené miesta pôsobenia potom ako sa nasyntetizujú v lokalizovanej oblasti rastliny. Dostupné dôkazy jasne ukazujú, že endogénne BRs nepodliehajú prevozu na dlhé vzdialenosti medzi výhonkami a koreňmi alebo inými orgánmi v rámci výhonkov. BRs nemôžeme legálne považovať za hormóny, ktoré sa správajú ako signály na dlhé vzdialenosti ako iné hormóny napríklad kyselina indolyl-3-octová (IAA) alebo kyseliny abscisová, aj keď je možné, že BRs môžu mať nepriamu úlohu pri signalizácii diaľkových signálov v rastlinách prostredníctvom predpokladaného účinku na transport IAA. Zdá sa, že BRs sú transportované cez krátke vzdialenosti, pretože sú syntetizované vo vnútri bunky ale chápané na povrchu bunky (Bishop & Jokota, 2001). Transport BRs z bunky produkujúcej BRs neprestáva na vonkajšku tejto bunky ale pokračuje na povrchu susedných buniek, ktoré samy vyvážajú BRs, čím sa zabezpečí relatívne veľké množstvo buniek v tkanive, ktoré majú rovnakú koncentráciu bioaktívnych BRs. To by viedlo ku koordinovanej odpovedi v príslušných bunkách. Predpokladá sa, že v prítomnosti receptora na vonkajšej strane bunky je uľahčená táto koordinovaná odpoveď. Ak by boli BRs produkované a vnímané výlučne tou istou bunkou, bez medzibunkového pohybu, mohlo by to zhoršiť koordinovanú odpoveď rastu na príslušnom tkanive (Symons *et al.*, 2008).

2.1.7 Analytické stanovenie brassinosteroidov

Koncentrácia endogénnych BRs vo vzorke rastlinného pôvodu je veľmi nízka. Úroveň BRs sa výrazne líši na základe toho, v akom type rastlinného tkaniva sa nachádzajú. V reprodukčných orgánoch ako je napríklad kvet alebo nezrelé semená dosiahne koncentrácia BRs približne pg/g čerstvej hmoty pričom vo vegetatívnych orgánoch ako sú výhonky a listy dosahuje úroveň BRs približne fg/g čerstvej hmoty (Kanwar *et al.*, 2017)

2.1.7.1.1 Extrakcia a purifikácia

Pred vývojom optimálnej extrakcie a purifikácie pre BRs by sme mali vedieť dva dôležité fakty, po prvé BRs sú neprchavé, vysoko hydrofóbne látky, ktorým chýbajú iónové vlastnosti a po druhé rastlinné tkanivá obsahujú len stopové množstvá BRs. (Tarkovská *et al.*, 2016). Na začiatok je nutné homogenizovať rastlinný materiál rozrušením bunečnej

steny čo sa väčšinou robí drvením materiálu v trecej miske za pomoci tekutého dusíka. Extrakcia prebieha pomocou rozpúšťadla, ktorého úlohou je extrahovať analyt s čo najväčšou účinnosťou a aby zamedzovalo extrakcii iných interferujúcich látok. Pre tento účel sú najčastejšie používané látky ako acetón, metanol, propanol, acetonitril poprípade zmes týchto solventov s vodnými roztokmi kyseliny octovej či mravenčej (Tarkovská *et al.*, 2014). Na chemickej povahe analyzovaného hormónu závisí optimálny výber metódy purifikácie. Najčastejšie používané metódy purifikácie sú extrakcia kvapalina-kvapalina, extrakcia na tuhej fáze (SPE) a purifikácia pomocou imunoafinitnej extrakcie (IAE). Princípom metódy kvapalina-kvapalina je rozdelenie analytu medzi dve nemiešateľné kvapaliny na základe ich rozpustnosti, najčastejšie sa využíva kombinácia vody a organického rozpúšťadla. Použitie tejto metódy je nevýhodne vzhľadom na použitie mnohých separačných krokov, časovej náročnosti a veľkej spotreby rozpúšťadiel (Fu *et al.*, 2011). Pri extrakcii na tuhej fáze sa využívajú kolónky, ktoré sú plnené pevnými sorbentami, ktoré viažu analyt na základe hydrofóbnych, iónových či polárnych interakcií. Pomocou premývacích činidiel sa odstránia interferujúce látky a rastlinný hormón je vytesnený z kolónky elučným činidlom, ktoré ruší väzby medzi fytohormónom a tuhým sorbentom (Tarkovská *et al.*, 2014). Imunoafinitná purifikácia je založená na interakcii medzi protilátkou a antigénom. Táto metóda síce poskytuje vysokú medz detekcie ale problém je v tom, že fytohormóny sú nízkomolekulové látky a nemôžu byť rozpoznané špecifickými antigénmi. Preto sa pri tejto metóde viažu protilátky na makromolekuly ako je napríklad serový albumín, pomocou ktorých sa môžu fytohormóny správať ako antigén (Fu *et al.*, 2011)

2..1.7.1.2 Analýza pomocou chromatografických metód

V podstate, chromatografické metódy závisia na rozdielnej distribúcii materiálov medzi dvomi nemiešateľnými fázami. Všeobecne ide o princíp distribúcie rozdielnych zložiek medzi vodnou a organickou fázou v separačnom lieviku. Podmienkou pre separáciu jednej zložky od druhej je, aby rozpustnosti týchto zložiek boli rozdielne vo vodnej a organickej fáze. Pri chromatografických separáciách, vymedzujeme dve chromatografické fázy, ide o stacionárnu a mobilnú fázu (Pingoud *et al.*, 2002).

2.1.7.1.2.1 Chromatografia na tenkej vrstve

Chromatografia na tenkej vrstve (TLC) sa môže použiť na predbežné a kvalitatívne potvrdenie zlúčenín v rastlinných extraktoch. Zvyčajne sa vykonáva na kontrolu čistoty a príležitostne na čistenie. Ako stacionárna fáza sa využíva oxid hlinitý, silikagel, silikagel s –C18, –NH₂ alebo –CN skupinami, celulóza. Stacionárna fáza je obvykle nanosená na hliníkových fóliách alebo sklenených doskách. Vzorka je rozpustená v rozpúšťadle a nanášaná na tenkú vrstvu na štart vo forme škvrny v priemere 2-6 mm. Táto vzorka nanosená na tenkej vrstve sa vloží do chromatografickej komory obsahujúcu mobilnú fázu a nechá sa vyvíjať. Pohyb mobilnej fázy závisí na kapilárnych silách na veľkosti pórov stacionárnej fáze. Vyvíjanie sa ukončí vybráním chromatogramu z komory a jeho následným vysušením. Identifikácia je založená na porovnávaní hodnôt retardačných faktorov (R_f) jednotlivých separovaných analytov. Táto metóda sa používala na začiatkoch identifikácie BRs (Konštantinova *et al.*, 2001)

2.1.7.1.2.2 Hmotnostná spektrometria

Táto metóda je primárne používaná na určenie molekulovej hmotnosti zlúčenín. Avšak táto metóda nie je reálna spektroskopická metóda, pretože nezahŕňa absorpciu alebo emisiu elektromagnetickej radiácie. Základné vybavenie hmotnostnej spektrometrie je ionizačný zdroj pomocou ktorého môžu byť ióny separované na základe ich hmotnosti. Tento zdroj je najdôležitejšia vlastnosť, pretože dokáže určiť typ informácii, ktoré sa môžu získať pre vzorku. Existuje mnoho krokov separácie, ktoré môžu byť používané v závislosti na molekulách, ktoré chceme študovať. Napríklad, pre zmesi nízkej molekulovej hmotnosti zlúčenín, ktoré sú taktiež prchavé je vhodná plynná chromatografia (GC). Také zmesi je vhodnejšie analyzovať touto metódou aby sa zabránilo ich rozkladu (Fisher & Arnold, 2012). Princíp hmotnostnej spektrometrie zahŕňa prvý krok, v ktorom je látka vnášaná do prvej časti spektrometra, do zdroja iónov. V tomto zdroji je látka prevedená do plynnej fázy a ionizovaná (napríklad chemicky, laserom a podobne). Vzniknuté ionizované fragmenty sú urýchlené ionizovaným polom. Rýchlosť, ktorú fragmenty získajú závisí na ich hmotnosti čiže čím väčšia je ich hmotnosť, tým menšia je ich rýchlosť. K získaniu hmotnostného spektra je potrebné zistiť aké fragmenty vznikli a aké je ich zastúpenie v súbore fragmentov. To sa dá zistiť v druhej časti spektrometra. Prvý spôsob získania spektra zahŕňa postup, kde fragmenty vyletujú z iónového zdroja a vstupujú do trubice magnetického separátoru, kde sa v magnetickom poli ich dráhy zakrivujú. Polomer dráhy závisí na rýchlosti fragmentov a preto sa v trubici vytvorí niekoľko zväzkov, ktoré vždy obsahujú fragmenty o rovnakej

hodnote pomeru hmotnosti a náboja m/z . Štrbinou je zaistené, aby na detektor iónov dopadal vždy len jeden zväzok. Zmenou urýchľovaného napätia v iónovom zdroji alebo zmenou intenzity magnetického poľa je možné meniť polomery dráh jednotlivých zväzkov tak, aby dopadali na detektor postupne. Druhý spôsob zahrňuje fragmenty, ktoré vstupujú z iónového zdroju do kvadrupólového filtra. Filter obsahuje elektródy, na ktoré je vložené také napätie, aby filtrom mohli k detektoru preletieť len fragmenty o určitej hodnote m/z , ostatné fragmenty zo súboru sú zachytené na elektródach. Zmena napätia na elektródach sa dosahuje preto, aby postupne mohli preletieť fragmenty o iných hodnotách m/z a dopadnúť na detektor. Oba opisované spôsoby pomocou ktorých získame hmotnostné spektrum, prebiehajú vo vysokom vákuu, aby nedochádzalo k vzájomným reakciám medzi vzniknutými iónmi. Dopad iónov na detektor sa prejaví zvýšením elektrického prúdu prechádzajúcim detektorom, tzv. píkom. Čím je tento pík vyšší, tým viac iónov dopadne na detektor a následne signál vychádzajúci z detektoru je spracovaný na hmotnostnom spektre. Hmotnostné spektra sa spravidla zobrazujú v normovanej podobe, to znamená, že znázorňujú pomerné zastúpenie fragmentov v súbore vzhľadom k najpočetnejšiemu zastúpeniu fragmentov (Opekar *et al.*, 2005).

2.1.7.1.2.3 Vysokovýkonná kvapalinová chromatografia

V HPLC je dosiahnutie vysokej účinnosti separačného procesu uskutočňované pomocou použitia kolón naplnených stacionárnou fázou o malej ale dobre definovanej veľkosti častíc. Separáčne kolóny sa vyznačujú vysokou hustotou a homogénou náplne stacionárnej fáze a teda aj veľkým hydrodynamickým odporom. Pre dosiahnutie dostatočného prietoku mobilnej fáze je nutné aplikovať pretlak jednotiek až desiatok Mpa (Opekar *et al.*, 2005). Táto separačná metóda je založená na rozdielnej distribúcii analytu medzi dvomi fázami- stacionárnou nepohyblivou (SF) a mobilnou fázou (MF). Separácia látok prebieha za vysokého tlaku, ktorý zabezpečujú čerpadlá MF. To ako dlho interagujú stanovené látky so SF je závislé na mnohých kritériách. Jedným z nich je intenzita medzimolekulových interakcií medzi stanovovanými látkami a SF. Ďalším dôležitým faktorom je zloženie mobilnej fáze. Každý kvapalinový chromatograf sa skladá zo zásobníku mobilnej fáze, čerpadla, degasseru, dávkovača vzorky, kolóny, detektoru a vyhodnocovacieho zaradenia.. Kvalitatívne informácie o separovanej látke zistíme z retenčného času, tj. čas, ktorý uplynie od nástreku vzorky do dosadenia maxima elučnej krivky. Napriek tomu, že HPLC bola použitá na monitorovanie BRs v rastlinných vzorkách, komplexnosť extrakčného postupu a čas potrebný na analýzu bol zvyčajne 3-4 dni na

spracovanie jedinej dávky vzoriek; nákladová efektívnosť a zložitosť súvisiaca so štruktúrou BR (nedostatok chromofóru) spôsobila zníženie záujmu výskumníkov o využitie tejto metódy (Kanwar *et al.*, 2017).

2.1.7.1.2.4 Plynová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou

Plynová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) ponúka selektívny a citlivý spôsob detekcie a kvantifikácie prírodných BRs. BRs sa musia transformovať na prchavé deriváty reakciou s derivatizačnými činidlami, ako je napríklad kyselina metylboritá na ich analýzu (Takatsuto, 1994). Na detekciu rastlinných hormónov v GC-MS sa používajú dva typy ionizačných režimov, tj chemická ionizácia (CI) a elektrónová ionizácia (EI). Menej fragmentárnych vzoriek sa pozoruje u CI, pretože používa nižšie množstvo energie, zatiaľ čo EI poskytuje viac fragmentových iónov a výsledkom sú lepšie štrukturálne informácie o BRs. Požiadavky na vzorky, vývoj metód, nákladová efektívnosť, citlivosť a čas analýzy sú stále oblasťami, ktorými sa treba zaoberať. Pre analýzu BRs je preto potrebná presnejšia a citlivejšia metóda s minimálnym vstupom a vyššou citlivosťou (Kanwar *et al.*, 2017).

2.1.7.1.2.5 Kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou

GC-MS výrazne prispela k analýze rastlinných hormónov a príbuzných metabolitov, napriek tomu analýza a vystavenie pri vysokých teplotách vedie k degradácii mnohých tepelne citlivých zlúčenín. Takže kvôli tomuto problému môže byť použitá kvapalinová chromatografia-hmotnostná spektrometria (LC-MS), čo ďalej dáva slobodu analyzovať zlúčeniny s derivatizačnými procesmi alebo bez nich, ako to vyžaduje GC-MS. Metódy založené na LC-MS stále nie sú produktívne pre analýzu BRs, kvôli ich nižšej citlivosti v režimoch skenovania. Navyše nižšie množstvá BRs v rastlinných vzorkách a interferencia matrice ďalej bránia ich analýze technikami založenými na MS (Xin *et al.*, 2016). Z tohto dôvodu boli vyvinuté a testované rôzne alternatívne metódy založené na rýchlej a citlivej detekcie BRs v rastlinných vzorkách. Napríklad ako analýza BRs na základe metódy predbežného spracovania na báze SPE v zariadeniach s dvojitou vrstvou extrakcie v tuhej fáze (DL / SPE) (Ding *et al.*, 2013). Ďalšia analytická metóda založená na extrakcii magnetickou tuhou fázou (MSPE) v kombinácii s derivatizáciou in situ (ISD) bola vyvinutá na detekciu BRs (Kanwar *et al.*, 2017). Podobne bola použitá metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v kombinácii s tandemovou hmotnostnou spektrometriou

(UHPLC-MS / MS) na detekciu 22 biologicky aktívnych BR a ich biosyntetických prekurzorov v kvete repky olejnej (*Brassica napus*) (Tarkowská *et al.*, 2016). UHPLC-MS / MS metóda vykazuje vysoké chromatografické rozlíšenie, uspokojivú citlivosť a selektivitu. Techniky založené na rôznych postupoch chromatografickej extrakcie, po ktorých nasledovala analýza pomocou UHPLC-MS / MS, vykazovali vysokú rozlišovaciu schopnosť, účinnú citlivosť a selektivitu s minimálnou požiadavkou na vzorky (Kanwar *et al.*, 2017).

3. Materiál a metodika

3.1 Rastlinný materiál

Pri pokusoch boli použité a puky hrachu (*Pisum sativum L.*, obr. 4) a kvety repky (*Brassica napus L.*, obr. 5). Kvety repky boli zbierané za plného kvetu na pokusných poliach Centra regiónu Haná. Puky hrachu boli zbierané v spolupráci s firmou Agritech Šumperk. K dispozícii boli štyri kategórie pukov, prvá kategória boli puky o veľkosti 2-3 mm, druhá kategória bola o veľkosti 4-6 mm, tretia kategória bola o veľkosti 6-8 mm a posledná štvrtá kategória obsahovala len vyzolované tyčinky. Rastlinný materiál bol po odbere okamžite umiestnený v tekutom dusíku a následne uskladnený v -70°C .



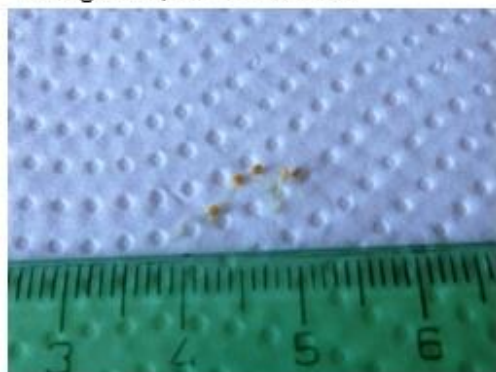
Kategorie 1, veľkosť 2-3 mm



Kategorie 2, veľkosť 4-6mm



Kategorie 3, veľkosť 6-8 mm



Kategorie 4, izolované tyčinky

Obr. 4. (*Pisum sativum L.*) a jeho rozdelenie podľa veľkosti



Obr. 5. Kvety *Brassica napus* L.

3.2 Prístrojové vybavenie

Analytické váhy – CPA225D (Sartorius, Nemecko)

Stolný laboratórny rotátor Stuart SB3- BB Scientific (Chelmsford,UK)

Centrifúga – Heraeus Biofuge Stratos, Trigon plus,(Česká republika)

Ultrazvuková lázeň Treanssonic T310, ELMA ® (Singen, Nemecko)

Magnetický stojan na mikrocentrifúgačné skúmavky Dynal MPC®- S (Nórsko)

pH meter pH 700 (Eutech Instruments, Singapur)

špičky a automatické pipety Eppendorf (Eppendorf, Nemecko)

Vortex – Velp Scantifica, Chemos, (Česká republika)

SPE kolónky Discovery® DPA-6S (Supelco, USA)

Miešačka mini rotátor PRS-22 (Česká republika)

Dusíková odparka TurboVap (USA)

Scintilačný počítač Beckman LS 6500 (USA)

3.3 Chemikálie

síran amónny , Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)

chlorid sodný , Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)

fosforečnan sodný , Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)

azid sodný , Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)

hovädzí sérový albumín (BSA) , Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)

glutaraldehyd , Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)

metanol , Lach- Ner s.r.o (Neratovice, Česká republika)

Acetonitril , Sigma- Aldrich (Steinheim, Nemecko)

Interní standardy BRs ($^2\text{H}_3$ BL, $^2\text{H}_3$ CS, $^2\text{H}_3$ epiBL, $^2\text{H}_3$ epiCS, $^2\text{H}_3$ TY) - Olchemims.r.o. (Olomouc, Česká republika)

Chitosanové magnetické mikročastice – tieto častice boli získané od Mgr. K. Pospíškovéj, PhD. z Regionálneho centra pokročilých technológií a materiálov UP Olomouc

3.3.1 Zloženie roztokov

PBS pufr: 0,87 g NaCl, 7,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ na 1 liter destilovanej vody; pH 7,2

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

0,01% (m/v) BSA v PBS puffri

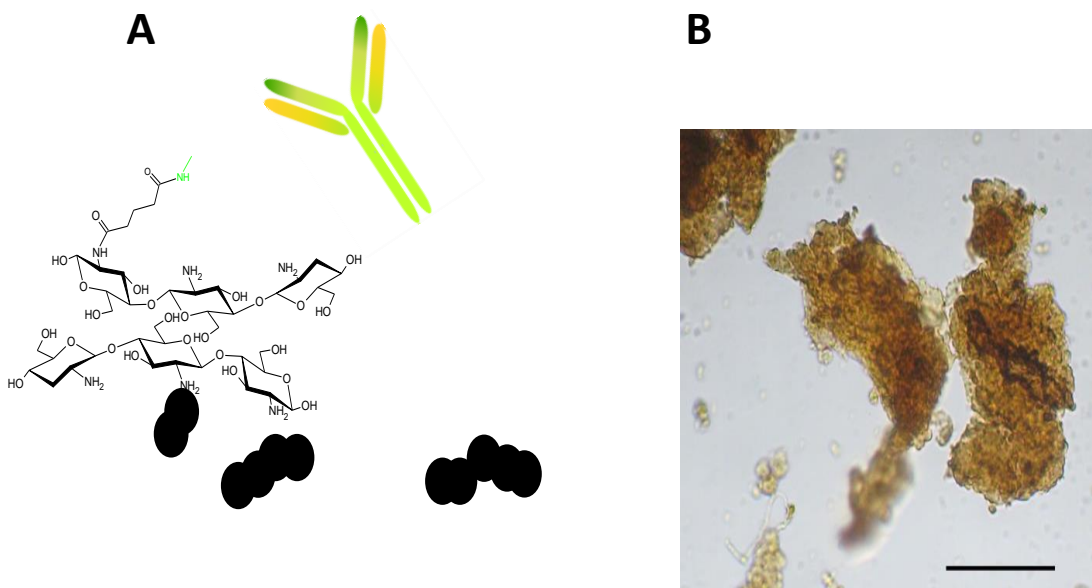
3.4 Metódy práce

3.4.1 Príprava protilátok metódou zrážania roztokom síranu amonného

K mierne zahriatej redestilovanej vode bol pridávaný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a bol pripravený mierne presýtený roztok, pH bolo upravené pomocou amoniaku na 7,2. Roztok bol prefiltrovaný do zásobnej fľaše, kde bol pridaný nerozpustený $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 1 ml ascitu obsahujúci monoklonálnej protilátky proti BRs bol nariadený 4 ml PBS puffru a pomaly bolo k roztoku pridávaných 5 ml roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a obsah skúmavky bol premiešaný vo vortexe. Roztok sa nechal stáť 30 minút pri laboratórnej teplote. Potom bol roztok scentrifugovaný po dobu 20 minút pri 4°C a 5000 otáčkach za minútu. Po centrifugácii bol supernatan odstránený a usadenina bola rozpustená v PBS puffri a prenesená do dialyzačnej trubice. Roztok bol dialyzovaný 3 dni proti PBS puffru pre dialýzu. Po skončení dialýzy bola v roztoku pomocou UV-VIS spektrofotometrie pri 280 nm stanovená koncentrácia imunoglobulínov a roztok bol uskladnený pri -20°C .

3.4.2 Konjugácia protilátky na magnetický nosič pomocou glutaraldehydovej metódy

100 mg magnetických chitosanových častíc (obr. 6) bolo 2x premytých 500 μ l redestilovanej vody. Potom k nim bol pridaný 1 ml 5 % (v/v) glutaraldehydu a roztok bol miešaný 3 hodiny pri lab. teplote. Po uplynutí doby bol zbytok glutaraldehydu odobratý a častice boli premyté 500 μ l redestilovanej vody a 500 μ l PBS pufru. K takto aktivovaným časticiam bol pridaný roztok obsahujúci 10 mg anti- BRs monoklonálnej protilátky a zmes bola miešaná 90 min. pri laboratórnej teplote. Nenaviazaná protilátka bola odstránená a častice boli premyté 2x 500 μ l PBS pufrom. K blokácii nešpecifickej väzby bol potom k časticiam pridaný 1 ml 0,01 % (m/v) BSA v PBS pufru. Po 30 min. inkubácii boli častice opäť 2x premyté 500 μ l PBS pufru a uskladnené v PBS pufri s prídavkom NaN_3 .



Obr. 6. Chitosanové magnetické mikročastice. (A) schematický náčrt väzby mikročastice s protilátkou, (B) Optická mikroskopia chitosanových mikročastíc, meradlo=100 μ m (prevzaté z Pospíšková & Šafarik, 2013).

3.4.3 Imunomagnetická purifikácia

Imunomagnetické častice uskladnené v PBS pufri s NaN_3 bolo nutné zregenerovať postupným premývaním častíc 500 μl týchto roztokov: redestilovaná voda, metanol (MeOH), redestilovaná voda, PBS pufr. Najprv bola testovaná návratnosť imunomagnetického sorbentu pomocou štandardu 28-[3 β - ^3H]-homokastasteronu a 24-[3 β - ^3H]-epikastasteronu. 25 μl týchto štandardov (východisková aktivita 0,22 mCi/ml) bolo pridaných k 475 μl roztoku PBS s magnetickými časticami. Táto zmes bola umiestnená na rotátor a inkubovaná pri laboratórnej teplote 30 min. Potom bol roztok odstránený a častice boli 2x premyté 500 μl redestilovanou vodou. Elúcia naviazaného BR štandardu prebiehala pomocou 500 μl MeOH. Množstvo výsledného BR v roztoku po elúcii bolo zmerané pomocou scintilačného počítača. Každá vzorka bola meraná v 3 opakovaníach. Rovnaký postup imunomagnetickkej purifikácie bol použitý aj pre stanovenie návratnosti pre štandard 24-epiBL (24-epibrassinolid) a pre stanovenie endogénnych BRs z reálnych rastlinných vzoriek, kde bol výsledok stanovený pomocou UHPLC-MS/MS. Po elúcii boli imunomagnetické častice opäť zregenerované postupným premývaním roztokmi: redestilovaná voda, metanol (MeOH), redestilovaná voda, PBS pufr a uskladnené v PBS pufri s prídavkom NaN_3 .

3.4.4 Extrakcia endogénnych BRs z rastlinného materiálu

Kvety repky boli zhomogenizované pod tekutým dusíkom v trecej miske a rozvážené v niekoľkých opakovaníach približne po 20 mg do 2 ml mikroskúmavok. Pokračovalo sa extrakciou, kde ku každému vzorku boli pridané 3 extrakčné guľičky, 1 ml extrakčného činidla 60 % acetonitrilu (v/v), vzorky boli umiestnené na 3 minúty do extrakčného mlynu a potom na 3 minúty do sonifikačného kúpeľa (ultrazvuku), následne do chladničky do rotátoru, kde sa extrahovali cez noc. Potom boli vzorky zcentrifugované 10 min. pri 15000 otáčkach za minútu. Supernatan bol prepipetovaný do čistých skúmavok a ku vzorkám bolo pridaných 25 pmol zmesi interných štandardov ($^2\text{H}_3$ BL, $^2\text{H}_3$ CS, $^2\text{H}_3$ epiBL, $^2\text{H}_3$ epiCS, $^2\text{H}_3$ TY). Potom boli vzorky purifikované pomocou imunomagnetickkej metódy alebo kombináciou SPE s klasickou imunoafinitnou chromatografiou. Každá vzorka bola meraná v 3 opakovaníach.

Kvety hrachu boli zhomogenizované pod tekutým dusíkom v trecej miske a rozvážené po približne 5 mg v niekoľkých opakovaníach do 2 ml mikroskúmavok. Extrakcia BRs prebiehala rovnako ako v predošlom prípade.

3.4.5 Extrakcia na tuhej fáze v kombinácii s imunoafinitnou chromatografiou

Následne bola časť vzorky kvety repky a hrachu pre porovnanie podrobené extrakcii na tuhej fáze (SPE) a imunoafinitnej chromatografii (IAC). Extrakcia na tuhej fáze prebiehala na kolónach Discovery DPA-6S(Supelco). Kolóny boli aktivované pomocou 1 ml 100 % MeOH a následne ekvilibrované pomocou 1 ml 60 % acetonitrilu. Potom boli nanesené vzorky a táto frakcia bola okamžite zachytávaná. Následne boli vzorky odparené do sucha.

Kolóny obsahujúce imunoafinitný gél (protilátky proti BRs, Oklestkova *et al.* 2017) boli najprv zregenerované premytím týmito činidlami: 3 ml PBS pufru (pH=7,2), 3 ml destilovanej vody, 3 ml 70 % acetonitrilu, 3 ml destilovanej vody, potom bola nanášaná vzorka, ktorá bola pred tým rozpustená v 75 μ l 100 % metanolu a 925 μ l PBS a vložená do ultrazvuku. Vzorka bola na kolónu nanášaná sedemkrát. Elúcia BRs bola uskutočnená pomocou 3 ml metanolu. Vzorky boli odparené do sucha a kolóny boli pred uschovávaním opäť zregenerované.

Obsah endogénnych BRs bol kvantifikovaný pomocou UHPLC-MS/MS (Oklešťková *et al.*, 2017), táto metóda nebola náplňou mojej bakalárskej práce, výslednú kvantifikáciu previedol doc. O. Novák.

4. Výsledky a diskusia

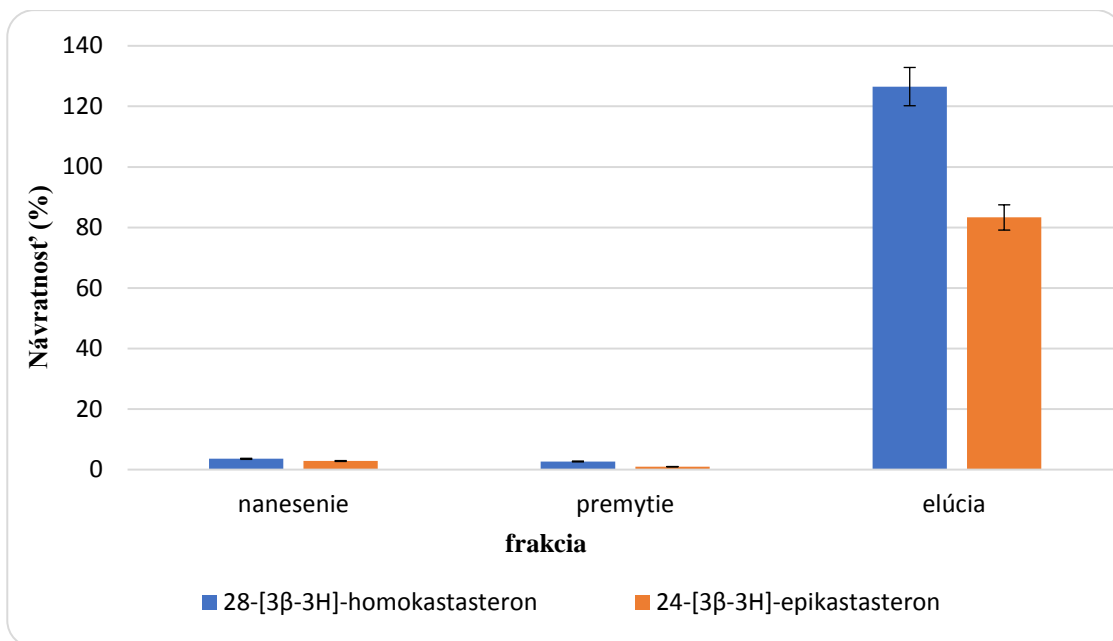
4.1. Izolácia protilátky a príprava imunomagnetických častíc

Monoklonálna protilátka proti brassinosteroidom, ktorá bola použitá v tejto bakalárskej práci bola vyvinutá v Laboratóriu rastových regulátorov a jej charakteristiky sú uvedené v publikácii Oklešťková *et al.* 2017. Protilátky boli pred naviazaním na magnetické častice vyizolované zo zápalovej brušnej tekutiny pokusnej myši a následne boli vyčistené pomocou dialýzy proti PBS pufru. Koncentrácia protilátok (10,3 mg Ig/1 ml roztoku) bola zmeraná na UV-VIS spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 280 nm.

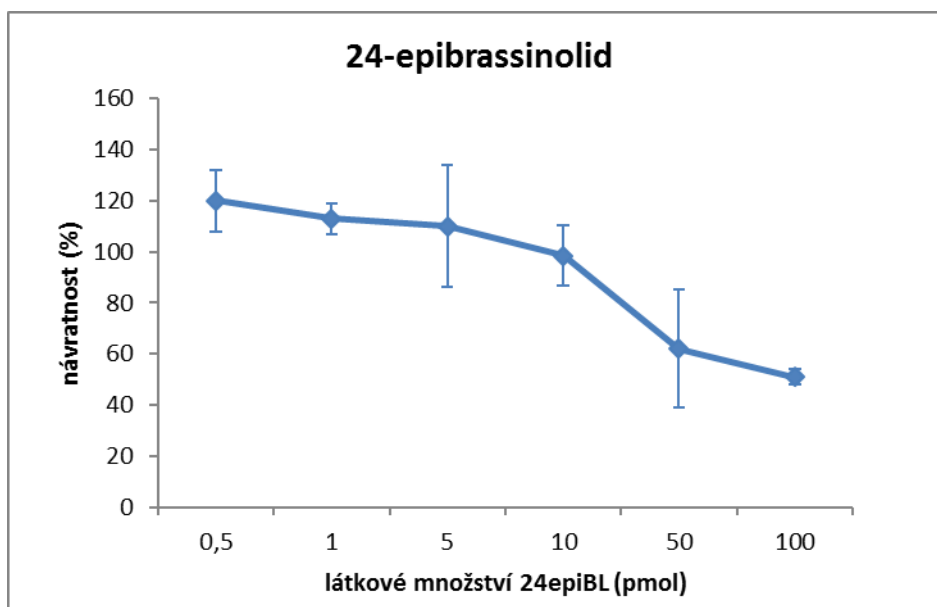
Ako konjugačná metóda pre naviazanie protilátok na magnetické mikročastice bola zvolená glutaraldehydová reakcia. Protilátky a magnetické mikročastice pokryté chitosanom obsahujú na svojom povrchu voľne amino skupiny, tento spôsob naviazania protilátok na magnetické častice obsahujúce na svojom povrchu amino skupiny bol použitý aj v práci Plačková *et al.* 2017.

4.2. Návratnosť imunomagnetickej purifikácie

U novo pripravených imunomagnetických častíc bolo nutné najprv otestovať ich návratnosť pre štandardy brassinosteroidov - 28-[3 β -³H]-homokastasteron, 24-[3 β -³H]-epikastasteron a 24-epibrassinolid. Schopnosť protilátky udržať štandardy brassinosteroidov (28-[3 β -³H]-homokastasteron, 24-[3 β -³H]-epikastasteron) počas purifikácie bola dokázaná zmeraním frakcií jednotlivých purifikačných krokov: nanesenie, premytie a elúcia (graf č.1). Výsledok potvrdil efektivitu purifikačného protokolu, kedy štandardy BRs mali najvyššiu návratnosť v elučnej fáze. Elúcia 28-[3 β -³H]-homokastasteronu presahovala 120 % a elúcia 24-[3 β -³H]-epikastasteron presahovala 80 %. Návratnosť magnetickej imunopurifikácie bola ďalej stanovená aj pre 24-epibrassinolid a bolo dokázané, že so stúpajúcim množstvom (0,5-100 pmol) 24-epiBL klesá návratnosť imunomagnetickej purifikácie (graf č.2).



Graf 1. Návratnosť imunomagnetickej purifikácie pre 28-[3β-³H]-homokastasteron a pre 24-[3β-³H]-epikastasteron.



Graf 2. Návratnosť magnetickej imunopurifikácie pre 24-epiBL.

4.3. Izolácia endogénnych brassinosteroidov z rastlinného materiálu

Je známe, že najvyšší obsah BRs sa nachádza v semenách a v kvetných častiach rastlín, rozhodli sme sa pre stanovenie týchto fytohormónov použiť vzorky pukov hrachu siateho a kvety repky olejnej. Vzorky pukov hrachu boli rozdelené podľa veľkosti do 3 kategórií a poslednú tvorili len vyizolované tyčinky z kvetu hrachu siateho. Pomocou imunomagnetickej extrakcie v kombinácii UHPLC-MS/MS sa podarilo vo všetkých 4 kategóriách vzorky pukov stanoviť BL, jeho množstvo sa pohybovalo okolo 300pmol/g DW. Najvyššie množstvo BL bolo zmerané vo vzorke tyčiniek (640pmol/g DW). Vo vzorkách kategórie 1-3 bol pomocou MIAC stanovený ešte homokastasteron (Tab. 1). Keďže puky kategórie 1 a tyčiniek bolo veľmi málo, boli pre porovnávaciu analýzu pomocou SPE+IAC použité len vzorky z kategórie 2 a 3. Pomocou tejto metódy a následnej kvantifikácie pomocou UHPLC-MS/MS sa u týchto vzoriek podarilo opäť stanoviť BL, HCS a navyše ešte CS, ktorého hodnoty boli pri MIAC pod limitom detekcie (Tab. 1). Rovnaký postup bol použitý aj u vzoriek z kvetu repky olejnej, kde sa pomocou MIAC podarilo opäť stanoviť BL a HCS a pomocou SPE+IAC ešte navyše CS a norCs (Tab. 2).

Z výsledkov analýzy UHPLC-MS/MS je viditeľné, že návratnosť interných štandardov pridaných k rastlinným extraktom pred izoláciou BRs je po MIAC až 10x nižšia než po kombinácii SPE a IAC (Tab. 3). Rovnako na MRM chromatograme brassinolidu izolovaného z kvetu repky pomocou imunomagnetickej extrakcie (A) je viditeľný pík brassinolidu a nižšie píky odpovedajúce nečistotám. Na porovnanie pri izolácii brassinolidu pomocou SPE kombinovanej s imunoafinitnou chromatografiou sa nečistoty na MRM chromatograme neobjavili. Z toho vyplýva, že metóda SPE kombinovaná s imunoafinitnou chromatografiou je presnejšia a citlivejšia pre kvantifikáciu endogénnych hladín BRs (obr.7).

Tabuľka 1 Množstvo endogénnych BRs v pukoch a tyčinkách hrachu siateho. Vzorok pukov boli rozdelené do štyroch skupín podľa veľkosti: 1. skupina- 2-3 mm, 2.skupina- 4-6 mm, 3.skupina- 6- 8 mm, 4.skupina – izolované tyčinky

BRs	Obsah BRs (pmol/g DW)					
	MIAC				SPE+IAC	
	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	Skupina 4	Skupina 2	Skupina 3
BL	281,3 ± 64,8	355,0 ± 59,5	311,1 ± 48,9	639,4 ± 115,6	268,1 ± 75,0	171,1 ± 24,6
CS	<LD	<LD	<LD	<LD	68,1 ± 4,7	88,2 ± 23,3
HCS	1515,6 ± 296,2	2296,6 ± 315,4	713,9 ± 125,4	<LD	298,6 ± 76,4	423,9 ± 116,1

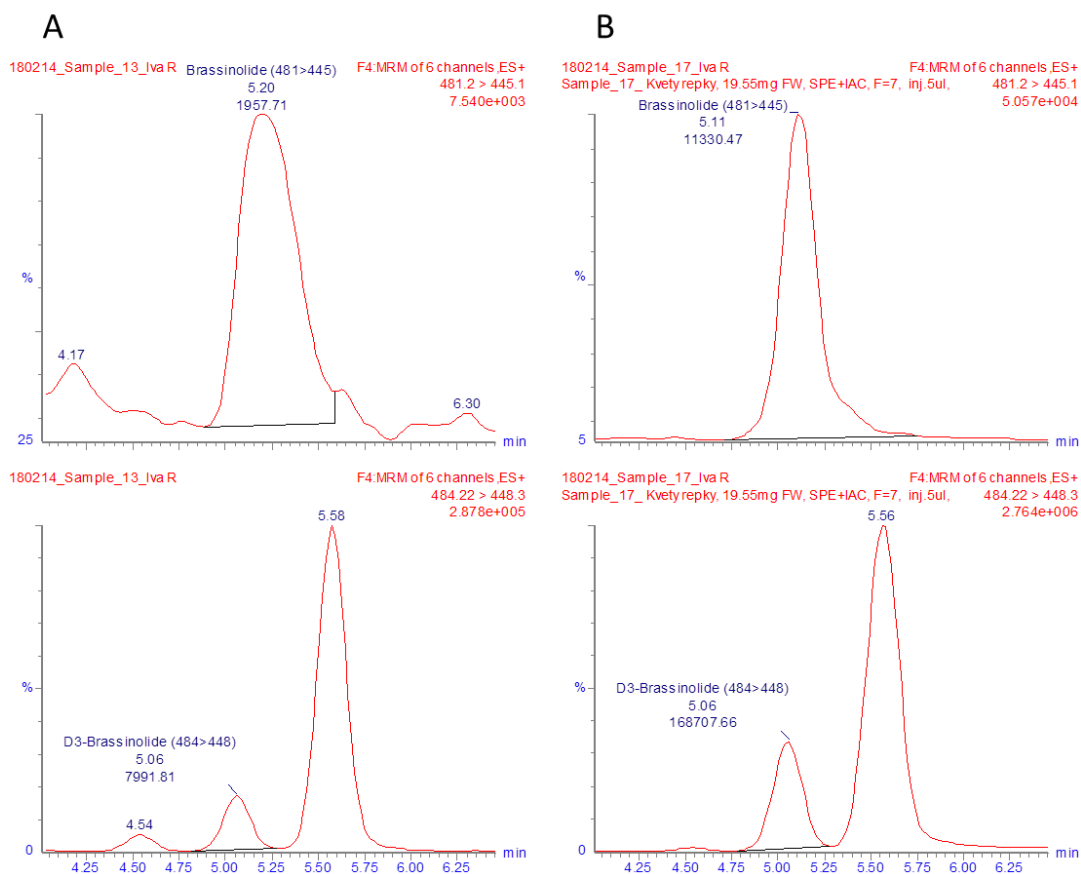
Pre nedostatok rastlinného materiálu SPE+IAC bolo prevedené len pre vzorky kategórie 2 a 3. LD –limit detekcie.

Tabuľka 2 Množstvo endogénnych BRs v kvetoch repky olejnej

Purifikačná metóda	Obsah BRs (pmol/g FW)			
	BL	CS	norCS	HCS
SPE-IAC	556,5 ± 121,4	90,7 ± 47,9	340,3 ± 65,0	91,1 ± 22,0
MIAC	895,3 ± 182,0	<LD	<LD	624,9 ± 117,9

Tabuľka 3 Návratnosť (%) interných štandardov pridaných k rastlinnému extraktu pred izoláciou BRs (25 pmol/ vzorka).

štandard	Metóda	Kvety repky (20 mg FW)			Kvety hrachu (5 mg DW)		
			±			±	
[² H ₃]BL	MIAC	0.89	±	0.21	0.88	±	0.11
	SPE+IAC	13.22	±	2.11	12.57	±	1.58
[² H ₃] 24-epiBL	MIAC	3.38	±	0.75	3.25	±	0.40
	SPE+IAC	27.40	±	4.30	29.40	±	2.51
[² H ₃]CS	MIAC	1.59	±	0.32	1.55	±	0.22
	SPE+IAC	14.15	±	2.49	13.83	±	1.81
[² H ₃] 24-epiCS	MIAC	1.94	±	0.42	1.88	±	0.36
	SPE+IAC	13.23	±	2.16	14.43	±	1.78



Obr.7. MRM chromatogramy brassinolidu (BL: 481>445) izolovaného z kvetu repky (20 mg FW) pomocou imunomagnetickej extrakcie (A) alebo SPE kombinovanej s imunoafinitnou chromatografiou (B) a jeho interného štandardu ($[^2\text{H}_3]$ BL: 484>448).

Proces imunomagnetickej izolácie fytohormónov bol prvýkrát popísaný v práci Plačková *et al.* 2017. Bola vyvinutá selektívna metóda založená na mikromagnetickej imunoafinitnej purifikácii pre izoláciu CKs z veľmi malých množstiev rastlinných tkanív (menej ako 0,1 mg čerstvej hmoty). Kapacita imunosorbentu a účinok komplexnej rastlinnej matrice boli testované purifikáciou použitím široké spektra koncentrácií CKs. Celkový rozsah návratnosti sa pohyboval od 30-80 % v závislosti od jednotlivých CKs. Imunoafinitná extrakcia používala skupinu špecifických monoklonálnych anti-CK protilátok imobilizovaných na magnetických časticách kombinovaných s citlivou ultrarýchlou hmotnostnou spektrometriou s detekčným limitom blízkym atomolu. Tento kombinovaný prístup umožnil metabolické profilovanie širokého spektra prirodzene sa vyskytujúcich CKs

(bázy, ribosidov a N⁹ glukosidov v častiach 1,0 mm koreňovej meristematickej zóny *Arabidopsis thaliana*).

Bolo preukázané, že magnetická imunoafinitná separácia predstavuje ľahký, extrémne rýchly postup a vyžadujúci minimálne množstvo rastlinného tkaniva.

Pokiaľ je známe, tak použitie magnetickej imunoafinitnej purifikácie pre izoláciu endogénnych BRs doposiaľ nebolo publikované. Zatiaľ bolo popísané použitie magnetických častíc pre izoláciu fytohormónov, ktoré ale fungujú na iných princípoch než reakcii antigénu a protilátky.

Luo a spolupracovníci v roku 2017 (Luo *et al.*, 2017) pripravili magnetické častice, ktorých povrch bol upravený pomocou polyméru na báze 4-(N,N-dimetylamino) fenyloboronovej kyseliny-ethylen glykol dimethanakyátu. Tieto častice potom použili k magnetickej extrakcii fytohormónov z kvetu repky olejnej. Touto metódou sa im podarilo stanoviť 16 fytohormónov zo skupiny cytokinínov, auxínov, giberellínov, jasmonátov, brassinosteroidov a kyselinu abscisovú. Pre selektívnu extrakciu BRs použili Ding a kolektív (Ding *et al.* 2014) magneticky mikroporézny oxid titaničitý, ktorý slúžil ako mikroextrakčný sorbent a zároveň ako mikroreaktor pre zachytenie a derivatizáciu BRs. Pomocou tejto metódy sa im podarilo stanoviť kastasteron a brassinolid vo vzorkách ryže a repky olejnej.

5. Záver

Cieľom bakalárskej práce bolo vyvinúť novú metódu pre izoláciu rastlinných hormónov brassinosteroidov založenú na imunomagnetickej purifikácii. U novo pripravených imunomagnetických častíc bola testovaná návratnosť purifikačného procesu pomocou tritiovaných štandardov BRs. Návratnosť bola nameraná vo fáze elúcie a jej hodnoty vyšli pre 28-[3 β -³H]-homokastasteron 120 % a pre 24-[3 β -³H]-epikastasteron presahovala 80 %. Bolo zistené, že najväčšie množstvo týchto štandardov bolo nájdené v elučnej frakcii, čo nám potvrdilo úspešnosť purifikačného procesu. Následne bola návratnosť testovaná ešte pomocou 24-epibrassinolidu, kde sa preukázalo, že stúpajúcou koncentráciou štandardu klesá kapacita protilátky.

Nakoniec bola imunomagnetická purifikácia použitá k izolácii endogénnych BRs z rastlinných vzoriek. Pre porovnanie boli rovnaké vzorky prečistené pomocou kombinácie SPE s imunoafinitnou chromatografiou. Z výsledkov vyplýva, že citlivosť imunomagnetickej purifikácie je približne 10 x nižšia ako kombinácia SPE+IAC. Zároveň sa potvrdilo, že jedнокroková imunomagnetická purifikačná metóda je vhodnejšia pre menšie (< 5 mg) navážky rastlinných vzoriek, ktoré neobsahujú toľko balastných látok.

Výsledky ukázali, že metóda extrakcie na tuhej fáze kombinovanej s imunoafinitnou chromatografiou zvyšuje účinnosť prípravy vzorky na kvantitatívnu analýzu BRs a tým pomáha prekonať hlavný problém a to je stanovenie BRs vo veľmi zložitých rastlinných matriciach.

6. Použitá literatura

1. Antonchick A., Svatoš A., Schneider B., Konštantinova O.V., Zhabinskii V.Z., Khripach V.A. (2005). 2,3-Epoxybrassinosteroids are intermediates in the biosynthesis of castasterone in seedlings of *Secale cereale*. *Phytochemistry* 66: 65–72.
2. Arteca R. (2008). Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 59: 3019-3026.
3. Bajguz A., Hayat S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochemistry* 47: 1–8.
4. Bajguz A., Tretyn A. (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 6: 1027-1046.
5. Belkhadir Y., Jaillais Y. (2015). The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol* 206: 522-540.
6. Bishop GJ, Yokota T. (2001). Plants Steroid Hormones Brassinosteroids: Current Highlights of Molecular Aspects on their Synthesis/Metabolism, Transport, Perception and Response. *Plant and Cell Physiology*. 42: 114-120.
7. Clouse S.D., Langford M., McMorris T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111: 671-678.
8. Din J., Mao L.J., Yuan B.F., Feng Y.Q. (2013). A selective pretreatment method for determination of endogenous active brassinosteroids in plant tissues: double layered solid phase extraction combined with boronate affinity polymer monolith microextraction. *Plant Methods* 9: 13.

9. Ding J., Wu H.J., Liu F.J., Yuan F.B., Feng Q.Y. (2014). Improved methodology for assaying brassinosteroids in plant tissues using magnetic hydrophilic material for both extraction and derivatization. *Plant Methods* 10: 39.
10. Ding J., Mao L.J., Wang S.T., Yuan B.F., Feng Y.Q. (2013). Determination of endogenous brassinosteroids in plant tissues using solid-phase extraction with double layered cartridge followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal* 24: 386-394.
11. Fisher J., Arnold J. (2012). Chemistry for biologists, 3rd edition, pp. 288-289, ISBN: 978-0-4156-8003-5.
12. Fu J. H., Sun X. H., Wang J. D., Chu J. F., Yan C. Y. (2011). Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin* 56: 355-366.
13. Grove D.M., Rohwedder K.W., Mandava N., Worley F.J., Warthern D.J., Steffens L.G, Flippen-Anderson L.J., Cook C.J. (1975). Brassinolide, a plant growth – promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216–217.
14. Jaillais Y., Hothorn M., Belkhadir Y., Dabi T., Nimchuk Z.L., Meyerowitz E.M., Chory J. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* 25: 232-237.
15. Jaillais Y., Vert G. (2016). Brassinosteroid signaling and Br1 dynamics went underground. *Current opinion in Plant Biology* 33: 92-100.
16. Kamlar M. (2010). Steroidní fytohormony: funkce, mechanismus účinku a význam. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická 104: 93-99.
17. Kanwar K.M., Bajguz A., Zhou J., Bhardwaj R. (2017). Analysis of Brassinosteroids in Plants. *J Plant Growth Regul* 36: 1002-1032.
18. Konštantinova O.V., Antonchick A.P., Oldham N.J., Zhabinskii V.N., Kripach V.A., Schneider B. (2001). Analysis of underivatized brassinosteroid by HPLC/APCI-MS. Occurrence of 3-epi-brassinolide in *Arabidopsis thaliana*. *Collect Czech. Chem Commun* 66: 1729-1734.

19. Luo X.T., Cai B.D., Chen X., Feng Y.Q. (2017). Improved methodology for analysis of multiple phytohormones using sequential magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 983: 112-120.
20. Oklešťková J., Rárová L., Kvasnica M., Strnad M. (2015). Brassinosteroids: synthesis and biological activities. *Phytochemistry Reviews* 14 (6): 1053-1072.
21. Oklešťková J., Tarkowská D., Eyer L., Elbert T., Marek A., Smržová Z., Novák O., Franek M., Zhabinski N.V., Strnad M. (2017). Immunoaffinity chromatography combined with tandem mass spectrometry: A new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones. *Talanta*: 432-440.
22. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z. (2005). *Základní analytická chemie*, pp. 37-38, ISBN: 978-80-246-0553-1.
23. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A. (2002). *Biochemical methods*, pp. 70, ISBN: 3-527-30299-9.
24. Plačková L., Oklešťková J., Pospíšková K., Poláková K., Buček J., Stýskala J., Zatloukal M., Šafařík I., Zbořil R., Strnad M., Doležal K., Novák O. (2017). Microscale magnetic microparticle-based immunopurification of cytokinins from Arabidopsis root apex. *Plan J.* (5): 1065-1075.
25. Rivier L., Crozier A. (1987). *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*, Vol 1 and 2. *Academic Press*, London: 401.
26. Santiago J., Henzler C., Hothorn M. (2013). Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science* 341: 889-892.
27. Symons G. (2008). Brassinosteroid transport. *Journal of Experimental Botany* 59: 17-24.
28. Takatsuto S. (1994). Brassinosteroids: distribution in plants, bioassays and micro-analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 658: 3-15.
29. Tarkowská D., Novák O., Floková K., Tarkowski P., Turečková V., Grúz J., Rolčík J., Strnad M. (2014). Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* 240: 55-76.

30. Tarkowská D., Novák O., Oklešťkova J., Strnád M. (2016). The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 408: 6799–6812.
31. Wang Z.Y., Bai M.Y., Oh E., Zhu J.Y. (2012). Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics* 46: 701-724.
32. Xia S., Zhu Z., Hao L., Chen J.G., Xiao L., Zhang Y., Li X. (2009). Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C subunit3 in Arabidopsis. *Plant Physiol* 150(4): 2009-17.
33. Xin P., Yan J., Fan J., Chu J., Yan C. (2013). A dual role of boronate affinity in high-sensitivity detection of vicinal diol brassinosteroids from sub-gram plant tissues via UPLC-MS/MS. *Analyst* 7: 138 (5).

Internetové zdroje

1. https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=81563
[online] 2009-04-01, [cit. 2011-05-09]. Dostupné na world wide web:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149639503800119>
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Rapeseed>