

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Štúdium heat shock proteínov 70 v hrachu

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Martina Sopkuliaková
Študijný program:	N0512A130009 Biochemie
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok:	2024

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Bc. Martina Sopkuliaková

Pod'akovanie

Moja veľká vd'aka patrí vedúcej diplomovej práce Mgr. Jane Sekaninovej, Ph.D. za ľudský prístup, odborné vedenie, trpezlivosť, cenné rady a čas, ktorý mi venovala. Rada by som poďakovala doc. RNDr. Lenke Luhovej, Ph.D. za odborné rady v rámci riešenia práce, a taktiež zamestnancom Katedry biochémie za ochotu a pomoc pri vypracovávaní experimentálnej časti diplomovej práce. V neposlednom rade by som chcela poďakovať svojim kamarátkam a blízkym za podporu počas štúdia.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Martina Sopkuliaková
Názov práce	Štúdium heat shock proteínov 70 v hrachu
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Heat shock proteíny (Hsps) sú funkčne prepojené proteíny, ktorých expresia je regulovaná množstvom mechanizmov v bunkách, keď sú bunky vystavené vysokým teplotám, a potláčajú denaturáciu molekúl spôsobenú vplyvom rôznych podnetov. Na základe vlastností a funkcie boli Hsp rozdelené do piatich hlavných tried Hsps charakterizovaných podľa ich približnej molekulovej hmotnosti: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé heat shock proteíny. V rastlinách sú Hsp70 najštudovanejšou skupinou Hsps, ktoré sa nachádzajú v cytozole, mitochondriách, chloroplastoch a endoplazmatickom retikule. Metóda ELISA patrí medzi kvantitatívne analytické metódy a má vysokú citlivosť a špecificitu. Využíva sa k detekcii a stanoveniu koncentrácie antigénov (peptidy, proteíny, hormóny, vitamíny, liečivá) alebo protilátok. Cieľom diplomovej práce bolo zaviesť a optimalizovať metódu ELISA pre stanovenie Hsp70 v hrachu, využiť optimalizovanú ELISA metódu pri štúdiu vplyvu abiotického stresového faktora (teplo, chlad) na produkciu Hsp70 v hrachu a porovnať výsledky s klasickým Western blotom. Pre stanovenia boli použité tri genotypy hrachu, a to Arvika, Arkta a Trendy, ktoré boli zozbierané v časových intervaloch 0; 0,5; 1; 2; 4 a 24 hodín po vystavení stresom. Výsledky stanovené metódou ELISA a Western blotom vzájomne korelovali. Bol detegovaný vplyv teplotného stresu na produkciu Hsp70 metódou ELISA. Dosiahnuté výsledky boli porovnané s uverejnenými zisteniami v podobných štúdiách a môžu slúžiť k ďalšiemu výskumu.

Kľúčové slová	Heat shock proteíny, Hsp70, ELISA, hrach siaty
Počet strán	90
Počet príloh	2
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Martina Sopkuliaková
Title	Study of heat shock proteins 70 in pea
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

Heat shock proteins (Hsps) are functionally linked proteins whose expression is regulated by a number of mechanisms in cells when cells are exposed to high temperatures, and they suppress the denaturation of molecules caused by various impulses. Based on properties and function, Hsps have been divided into five major classes of Hsps characterized by their approximate molecular weight: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, and small heat shock proteins. In plants, Hsp70 is the most studied group of Hsps, which are found in the cytosol, mitochondria, chloroplasts, and endoplasmic reticulum. The ELISA method is one of the quantitative analytical methods and has high sensitivity and specificity. It is used to detect and determine the concentration of antigens (peptides, proteins, hormones, vitamins, drugs) or antibodies. The aim of this thesis was to establish and optimize an ELISA method for the determination of Hsp70 in peas, to use the ELISA method in the study of the influence of abiotic stress factors (heat, cold) on the production of Hsp70 in peas, and to compare the results with the classical Western blot. Three pea genotypes were used for the determinations, namely Arvika, Arkta, and Trendy, which were harvested at time intervals of 0; 0,5; 1; 2; 4 and 24 hours after exposure to stresses. The results determined by ELISA and Western blot correlated with each other. The effect of temperature stress on Hsp70 production was detected by ELISA. The results achieved were compared with published findings in similar studies and may serve for future research.

Keywords	Heat shock proteins, Hsp70, ELISA, <i>Pisum sativum</i>
Number of pages	90
Number of appendices	2
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČASŤ	2
2.1	Heat shock proteíny	2
2.1.1	Klasifikácia heat shock proteínov	2
2.1.1.1	Heat shock proteíny 100	3
2.1.1.2	Heat shock proteíny 90	3
2.1.1.3	Heat shock proteíny 60	3
2.1.1.4	Malé heat shock proteíny	4
2.2	Heat shock proteíny 70	4
2.2.1	Štruktúra domén Hsp70	6
2.2.2	Pomocné ko-chaperóny pre Hsp70	7
2.2.3	Faktory tepelného šoku	8
2.3	Typy stresov	9
2.3.1	Vysoká teplota.....	11
2.3.2	Chlad	11
2.3.3	Sucho.....	11
2.3.4	Salinita	12
2.3.5	Ťažké kovy	13
2.4	Metódy detekcie heat shock proteínov 70.....	13
2.5	ELISA	15
2.5.1	Typy ELISA metódy	17
2.5.1.1	Priama ELISA	17
2.5.1.2	Nepriama ELISA.....	18
2.5.1.3	Sendvičová ELISA.....	19
2.5.1.4	Kompetitívna ELISA	20
2.6	Elektroforéza SDS-PAGE	22
2.7	Western blotting.....	23
2.8	Imunodetekcia.....	24
2.8.1	Štruktúra a funkcia protilátky	25
2.8.2	Monoklonálne a polyklonálne protilátky	26
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	28
3.1	Rastlinný materiál	28
3.2	Použité protilátky	28
3.3	Použité chemikálie	28
3.4	Použité prístroje a experimentálne vybavenie	30
3.5	Zloženie a príprava roztokov	31
3.6	Metódy	32
3.6.1	Pestovanie rastlinného materiálu	32
3.6.1.1	Rastlinný materiál I.....	32
3.6.1.2	Rastlinný materiál II.....	33
3.6.1.3	Rastlinný materiál III.....	33
3.6.2	Príprava rastlinných extraktov použitých pri SDS-PAGE	33
3.6.3	SDS-PAGE.....	34
3.6.4	Semi-dry Western blotting	35
3.6.5	Imunochemická detekcia proteínov na membráne.....	35
3.6.6	Príprava rastlinných extraktov použitých pri ELISA metóde	35

3.6.7	ELISA	36
4	VÝSLEDKY.....	38
4.1	Testovanie primárnych protilátok pre stanovenie množstva Hsp70 pomocou metódy Western blot	38
4.1.1	Použitie monoklonálnej protilátky (Merck)	38
4.1.2	Použitie polyklonálnej protilátky (Agrisera).....	39
4.1.3	Porovnanie monoklonálnej a polyklonálnej protilátky	41
4.2	Optimalizácia metódy ELISA	42
4.2.1	Výber vhodnej ELISA doštičky	42
4.2.2	Výber vhodného väzbového pufru	44
4.2.3	Testovanie vhodného blokačného činidla	45
4.2.4	Optimalizácia vhodného riedenia vzorky.....	46
4.2.5	Stanovenie vhodného riedenia primárnej protilátky	47
4.2.6	Testovanie možných interferencií počas ELISA metódy.....	48
4.3	Stanovenie koncentrácie Hsp70 v používanom kalibrátore	50
4.4	Porovnanie stanovenia množstva Hsp70 tromi metódami	52
4.4.1	Stanovenie množstva Hsp70 metódou ELISA (optimalizovaný postup) 52	
4.4.2	Stanovenia množstva Hsp70 metódou Western blot.....	53
4.4.3	Stanovenia množstva Hsp70 metódou ELISA (komerčný kit).....	55
4.5	Aplikácia optimalizovanej ELISA metódy pre stanovenie množstva Hsp70 v hrachu siatom po vystavení tepelnému a chladovému stresu.....	56
5	DISKUSIA	59
6	ZÁVER.....	65
7	LITERATÚRA	66
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	71
9	PRÍLOHY	72
9.1	Plant Heat Shock Protein 70 (HSP70) ELISA Kit. Cat.No: MBS9370793	72
9.2	Stanovenie množstva Hsp70 v semenčikoch hrachu pomocou ELISA metódy	76

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

Vypracovať literárnu rešerš:

- Heat shock proteíny so zameraním na Hsp70
- ELISA
- Metódy ELISA pre rastlinné Hsp70

Experimentálna časť:

- Zavedenie metódy ELISA so štandardmi.
- Využitie zavedenej metódy ELISA pri štúdiu vplyvu abiotického stresového faktora na produkciu Hsp70 u hrachu.
- Porovnanie výsledkov stanovení Hsp70 ELISA metódou a klasickým Western blotom, diskusia výhod a nevýhod a úskalí jednotlivých metód.

1 ÚVOD

Heat shock proteíny (Hsps), v preklade proteíny tepelného šoku, sú v prokaryotických aj eukaryotických organizmoch rozšírené a všadeprítomné proteíny. Prvýkrát boli objavené v reakcii na zvýšenie teploty, ale mnoho dôkazov naznačuje, že Hsps sa podieľajú aj na množstve ďalších reakcií. Predovšetkým pôsobia ako chaperóny a zúčastňujú sa na zostavovaní, stabilizácii a dozrievaní proteínov a proteínových komplexov. Okrem svojej funkcie chaperóna hrajú Hsps úlohu vo vývoji rastlín a reakcii na abiotické a biotické stresové podmienky vrátane salinity, sucha či infekcie patogénmi (Berka et al., 2022).

Hsps sa vo všeobecnosti rozdeľujú na päť hlavných tried podľa ich molekulovej hmotnosti: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé heat shock proteíny (sHsps z angl. small heat shock proteins). Trieda Hsp70 je vysoko konzervovaná vo všetkých organizmoch a nachádza sa v rôznych častiach bunky ako sú mitochondrie, cytozol, chloroplasty a endoplazmatické retikulum. Hsp70 sa podieľajú na proteínovej homeostáze, zabraňujú zhlukovaniu proteínov a využívajú energiu hydrolýzy ATP na translokáciu a sprostredkovanie správneho rozkladania a opätovného skladania proteínov (Kang et al., 2022).

V rastlinnom materiáli je možné Hsp70 detegovať použitím rôznych metód. Jednou z používaných je aj metóda ELISA, ktorá patrí medzi enzýmové imunotesty. Pri tomto type analýzy je jedna zo zložiek reakcie nešpecificky adsorbovaná alebo kovalentne viazaná na pevný povrch, ktorým môže byť mikrotitračná jamka, magnetická častica alebo plastová guľôčka. Po naviazaní antigénu na pevný povrch je pridaná špecifická primárna protilátka viažúca sa len na testované proteíny. Naopak, sekundárna protilátka je konjugovaná s enzýmom a viaže sa na primárnu protilátku, ktorá nie je konjugovaná s enzýmom. Detekcia sa vykonáva pridaním substrátu, ktorý môže vyvolať farebnú zmenu. Najčastejšie používanými substrátmi sú fenolová donor:oxidoreduktáza peroxidu vodíka (chrenová peroxidáza, HRP, EC 1.11.1.7) alebo fosfát-monoester fosfohydroláza (alkalická fosfatáza, AP, EC 3.1.3.1). Reakciu enzým-substrát možno zastaviť použitím kyseliny sírovej. Výsledok sa následne odčíta spektrofotometricky pri potrebnej vlnovej dĺžke v závislosti od použitého konjugátu (Suleyman, 2015; Alhajj et al., 2023).

Diplomová práca je venovaná optimalizácii metódy ELISA pre stanovenie množstva Hsp70 v hrachu siatom, ktoré boli doteraz detegované len pomocou Western blotu s následnou imunodetekciou. Optimalizovaná metóda môže ďalej slúžiť k štúdiu Hsp70 v rôznom rastlinnom materiáli.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Heat shock proteíny

Hsps objavil taliansky vedec Ferruccio Ritossa, ktorý si všimol rýchlu transkripčnú odpoveď na tepelný šok u *Drosophila melanogaster* a svoje výsledky napokon publikoval v roku 1962. Hsps sú rodinou funkčne prepojených proteínov, ktoré regulujú svoju expresiu, keď sú bunky vystavené vysokým teplotám a potláčajú denaturáciu molekúl spôsobenú vplyvom rôznych podnetov. Termín "heat shock proteín" je v súčasnosti nesprávny, pretože Hsps sa neexprimujú len pri vysokej teplote, ale aj pri iných stresoch ako je chlad (Ul Haq et al., 2019), sucho (Hussain et al., 2019), salinita (Isayenkov & Maathuis, 2019) alebo ťažké kovy (Kul et al., 2021). Sú dôležitými zložkami, ktoré prispievajú k bunkovej homeostáze za priaznivých a škodlivých podmienok rastu v prokaryotických aj eukaryotických bunkách. Všetky Hsps sú charakterizované prítomnosťou karboxylového konca nazývaného doména tepelného šoku. Štruktúrne majú spoločnú podskupinu chaperónov kontrolujúcich formu skladania proteínov, ktoré sú základnou bunkovou zložkou zodpovednou za rôzne kľúčové funkcie vrátane syntézy, transportu za normálnych podmienok a denaturácie proteínov pri strese a iných bunkových funkciách (Al-Whaibi, 2011; Jee, 2016; Khan et al., 2021; Batoool et al., 2022; Berka et al., 2022).

Hsps sú dôležité v životnom cykle rastlín, pretože ich úlohou je ochrana pred biotickými a abiotickými stresmi. Počas stresu dochádza k škodlivým štruktúrnym a funkčným zmenám, ktorým podliehajú mnohé proteíny. Pre bunky je obzvlášť dôležité udržiavať proteíny v ich funkčných konformáciách, zabrániť zhlukovaniu neprirodených proteínov či pomôcť opätovnému skladaniu denaturovaných bielkovín. Pri bunkovej ochrane spolupracujú rôzne triedy Hsps a zohrávajú, niekedy sa prekrývajúce úlohy. Okrem toho, sa Hsps podieľajú aj na raste a vývoji rastlín za normálnych podmienok, kam patrí napr. vývoj kvetov, semien a plodov (Wang et al., 2004; Ul Haq et al., 2019).

2.1.1 Klasifikácia heat shock proteínov

Hsps sú konzervované takmer vo všetkých organizmoch od baktérií po huby, rastliny a zvieratá vrátane ľudí (Ul Haq et al., 2019). Vo všeobecnosti sa v rastlinách navrhlo päť hlavných tried Hsps charakterizovaných podľa ich približnej molekulovej hmotnosti: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé Hsps, ktorých molekulová hmotnosť sa pohybuje od 15 do 43 kDa (Al-Whaibi, 2011; Jee, 2016). Každá rodina Hsps obsahuje viacero

izoforiem, z ktorých každá je nezávisle regulovaná. Proteíny sa od seba líšia svojou substrátovou špecifickosťou a bunkovou funkciou, ale často navzájom spolupracujú (Bierkens et al., 1998).

2.1.1.1 Heat shock proteíny 100

Rodina Hsp100, známa aj pod označením kazeínová lytická proteínáza (Clp), je klasifikovaná Hsps s molekulovou hmotnosťou od 100 do 104 kDa. Hsp100 získavajú energiu z ATP a v podmienkach silného tepelného šoku zachovávajú určité kľúčové polypeptidy neporušené tým, že umožňujú resolubilizáciu nefunkčných proteínových zhlukov, a taktiež pomáhajú degradovať nevratne poškodené polypeptidy. Hsp100 sú zvyčajne lokalizované v cytozole alebo v jadre a aj napriek tomu sa uvádza, že sa podieľajú na oprave proteínov denaturovaných teplom v endoplazmatickom retikule (Hänninen et al., 1999; Park & Seo, 2015; Sable & Agarwal, 2018).

2.1.1.2 Heat shock proteíny 90

Zastúpenie Hsp90 v rastlinných bunkách predstavuje približne 1 – 2 % z celkových proteínov. Nachádzajú sa hlavne v cytoplazme a len zriedkavo v endoplazmatickom retikule, mitochondriách a chloroplastoch. Základná molekula Hsp90 napomáha k správne skladaniu iných proteínových substrátov, pôsobí ako mediátor v signálnych dráhach rastlinného abiotického stresu a má ústrednú rolu v dráhach, ktoré regulujú rast (Xu et al., 2012; Khan et al., 2021). Monomér Hsp90 obsahuje tri domény, ktorými sú nukleotid viažuca doména na N-konci, stredná doména a C-koncová doména. Pre naviazanie ko-chaperónu obsahuje C-koncová doména motív metionín-glutamín-glutamín-valín-kyselina asparágová (MEEVD). Aktivita skladania je založená na dynamických zmenách konformácie závislých od ATP a je regulovaná pomocou viacerých ko-chaperónov (Hu et al., 2022).

2.1.1.3 Heat shock proteíny 60

Hsps s molekulovou hmotnosťou okolo 60 kDa, známe aj pod označením chaperoníny, zvyčajne fungujú vo vnútri mitochondrií spolu s ko-chaperonom Hsp10, kde sa podieľajú na udržaní proteínovej homeostázy. Nachádzajú sa však aj v iných súčastiach bunky vrátane endoplazmatického retikula, cytozolu, chloroplastov a jadra. Väčšina Hsp60 je indukateľná teplom a rovnako potrebná na zabránenie zhlukovania proteínov

či sprostredkovanie skladania (Kang et al., 2022). Kľúčová úloha chaperonínov spočíva v tom, že pomáhajú širokému spektru novo syntetizovaných a novo translokovaných proteínov dosiahnuť ich natívne formy (Wang et al., 2004).

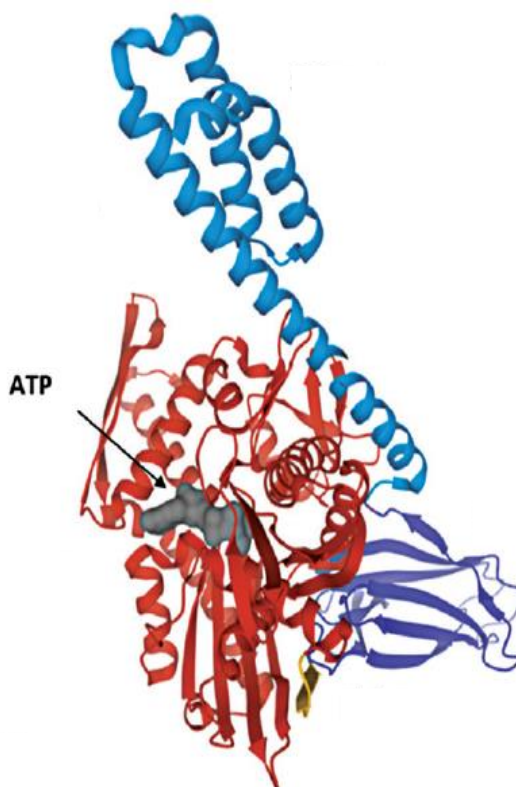
2.1.1.4 Malé heat shock proteíny

Malé Hsps sú jedinečné, evolučne zachované a ich funkcia nie je závislá od ATP. Molekulová hmotnosť sHsps sa pohybuje od 12 do 42 kDa, a podľa nej sa môžu ďalej detailnejšie deliť do tried ako napríklad Hsp20 alebo Hsp27. Hsp20 majú molekulovú hmotnosť v rozsahu od 15 – 22 kDa, pričom členovia danej triedy obsahujú odlišné aminokyselinové sekvencie, ktoré sa nenachádzajú v iných Hsps. sHsps nedokážu preskladať cudzie proteíny, ale môžu sa viazať na čiastočne poskladanú alebo poškodenú časť substrátu, a tým zabráni rozloženiu stabilných proteínov (Khan et al., 2021). sHsps, ako súčasť mechanizmov kontroly kvality bunkových proteínov, sa pri environmentálnych stresoch považujú za prvú líniu obrany proti stresu, ktorý ohrozuje proteíny buniek. Členovia sHsps tiež pôsobia ako regulačné molekuly, a podieľajú sa na stresom indukovanej signálnej transdukcii, snímaní stresu a aktivácii génov súvisiacich s abiotickým stresom. Okrem toho sHsps reagujú aj na biotické stresy tým, že majú podiel na zhromažďovaní rôznych proteínov rezistencie, a teda na koordinácii kaskády obranného signálu (Wu et al., 2022).

2.2 Heat shock proteíny 70

Hsp70 patria medzi najštudovanejšiu skupinu Hsps nachádzajúcu sa v rastlinách. Hsp70 (obr. 1) sú vysoko konzervované ATP-dependentné chaperóny pre novosyntetizované proteíny. Ak nedôjde k interakcii s peptidovým substrátom, Hsp70 zostane viazaný na ATP, čo sa vyznačuje veľmi slabou ATP-ázovou aktivitou. Hsp70 pomáhajú pri skladaní regulačných proteínov, aby zamedzili ich hromadeniu vo forme zhlukov, a zabraňujú zoskupovaniu denaturovaných proteínov. Podieľajú sa aj na mechanizme importu a translokácie proteínov a podporujú proteolytickú degradáciu defektných proteínov ich prenosom do lyzozómov alebo proteazómov. Zohrávajú tiež kľúčovú úlohu v sieťach prenosu signálov či regulácii bunkového cyklu. Okrem toho, Hsp70 spolu so sHsps, majú kľúčovú úlohu pri ochrane rastlinnej bunky pred škodlivými účinkami tepelného stresu. Hsp70 teda plnia potrebné funkcie v rôznych formách života (Al-Whaibi, 2011; Khan et al., 2021; Batool et al., 2022; Berka et al., 2022).

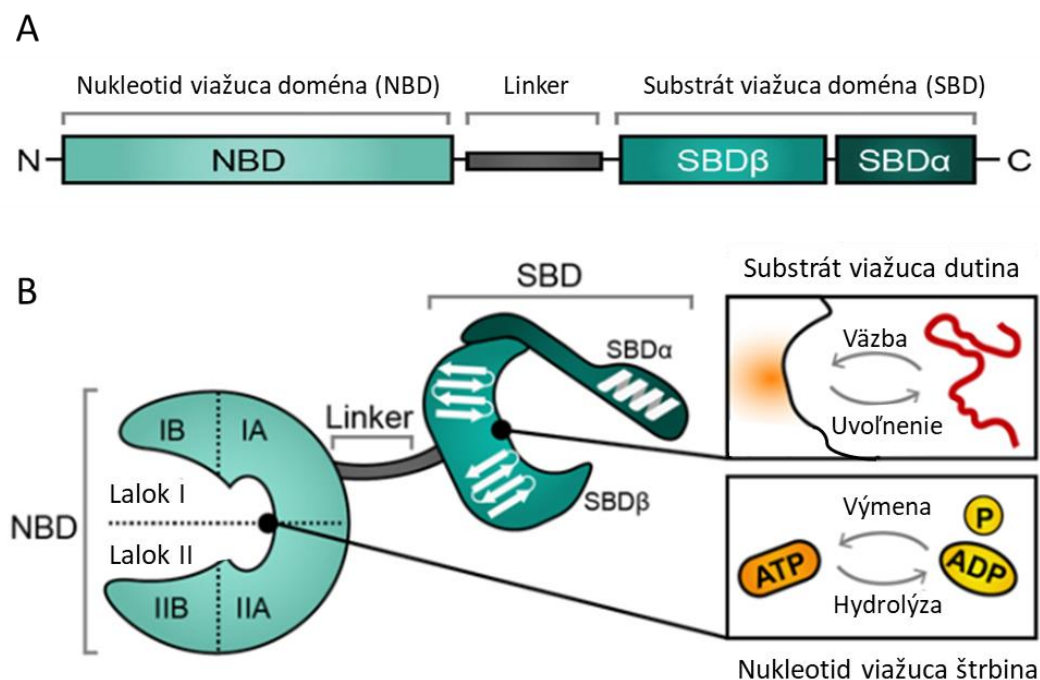
V rastlinách sa Hsp70 nachádzajú v cytozole, mitochondriách, chloroplastoch a endoplazmatickom retikule. Táto lokalizácia je určená konzervovanými N- a C-koncovými sekvenciami a často sa používa na rozdelenie Hsp70 do štyroch hlavných podskupín: cytozolové/jadrové, plastidové, mitochondriálne a heat shock proteíny endoplazmatického retikula. Tie, ktoré sú zamerané na rovnakú organelu, majú podobnú evolučnú históriu. Hsp70 lokalizované v endoplazmatickom retikule a cytozole vznikli duplikáciou génov a následnou divergenciou. Hsp70 lokalizované v mitochondriách a chloroplastoch sa vyvinuli prenosom génov z endosymbiontov (Berka et al., 2022). Hsp70 sú pre bunky kľúčové ako konštitutívne a všadeprítomne exprimované proteíny, pričom ich expresia nie je indukovaná len tepelným šokom, ale takmer všetkými typmi rastlinných stresov (Hýsková et al., 2021a).



Obr. 1: Štruktúra Hsp70 s naviazaným ATP. Prevzaté a upravené z Berka et al., 2022.

2.2.1 Štruktúra domén Hsp70

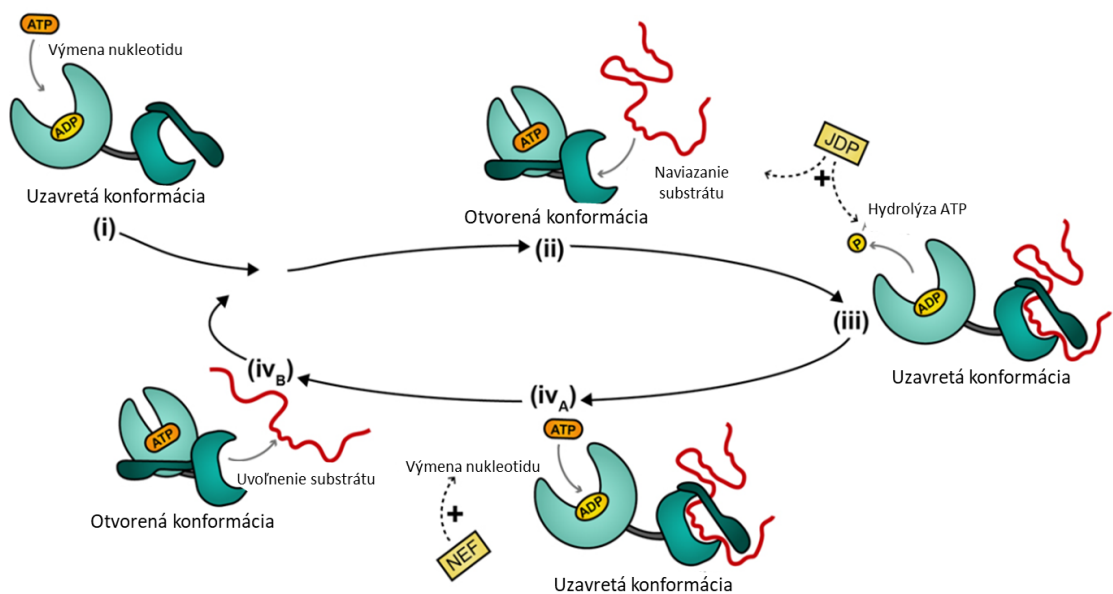
Všetky Hsp70 majú dve funkčné domény, ktorými sú nukleotid viažuca doména (NBD) na N-konci a substrát viažuca doména (SBD) na C-konci (obr. 2A). Medzi doménami, ktoré majú veľkosť približne 40 kDa a 25 kDa, sa nachádza flexibilný medzidoménový linker, ktorý je citlivý na štiepenie proteázou. NBD je označovaná ako N-terminálna ATP-ázová doména, ktorá drží spolu s ATP hydrolyzujúcim sa v prítomnosti vody na ADP a vykonáva regulačné funkcie. NBD má aktívny záhyb skladajúci sa z laloku I a II (obr. 2B). Medzi lalokmi existujú hlboké štrbiny a nukleotid sa viaže v spodnej časti. Laloky sú ďalej rozdelené na subdomény A a B. SBD Hsp70 je zložená z dvoch subdomén, SBD α a SBD β . SBD β sa skladá z ôsmich β -reťazcov usporiadaných do dvoch β -listov. Za dvomi subdoménami nasleduje C-terminálny chvost s motívom EEVD (konzervovaný glutamín-glutamín-valín-kyselina asparágová, EEVD), ktorý rozpoznáva niekoľko ko-chaperónov. SBD sa spája s hydrofóbnymi zvyškami substrátových proteínov v neprirodzenej konformácii (Sung et al., 2001; Usman et al., 2017; Sable & Agarwal, 2018; Kohler & Andréasson, 2020; Hu, et al., 2022).



Obr. 2: Schematické znázornenie hlavných domén Hsp70 spojených medzidoménovým linkerom (A). Zloženie nukleotid viažúcej domény (NBD) z laloku I a laloku II a následne zobrazenie naviazania nukleotidu do NBD a substrátu do substrát viažúcej domény (SBD) (B). Prevzaté a upravené z Kohler & Andréasson, 2020.

2.2.2 Pomocné ko-chaperóny pre Hsp70

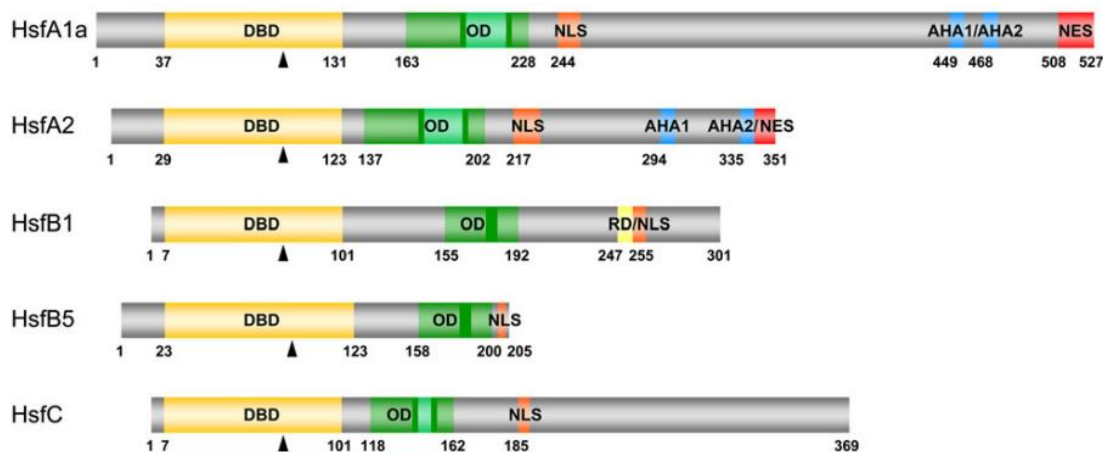
Hsp70 majú pomocné proteíny označované ako ko-chaperóny, ktoré pomáhajú pri ich funkcii. V bunke sú prítomné dva typy ko-chaperónov, a to proteíny s J-doménou (z angl. J domain protein, JDP) a faktor výmeny nukleotidov (z angl. nucleotide exchange factors, NEF). JDP rozpoznáva hydrofóbne znaky na rozložených alebo vznikajúcich proteínoch a odovzdáva substráty Hsp70. Chaperónová aktivita Hsp70 je založená na alosterickej konformačnej zmene Hsp70, ktorá je závislá od ATP (obr. 3). V tomto procese je ADP viazané na Hsp70, ktoré rozpoznávajú substrát v doméne SBD s vysokou afinitou a dochádza k naviazaniu substrátu. Proteíny J-domény spúšťajú hydrolýzu ATP pomocou Hsp70 a indukujú pevnú väzbu peptidu. Faktory výmeny nukleotidov pomáhajú pri ATP-ADP výmennom cykle. Väzba NEF katalyzuje uvoľňovanie ADP z proteínu Hsp70, čím umožňuje väzbu ATP, a tým sa posúva cyklus skladania dopredu. Uvoľnenie ADP mení uzavretú konformáciu na otvorenú a uvoľňuje sa molekula substrátu, pretože ATP viazaná konformácia Hsp70 má nízku afinitu k substrátom. Nukleotid sa opäť vymení za ATP molekulou Hsp70, aby sa začal ďalší cyklus. Vyňatý substrát by sa mohol znovu naviazať na Hsp70 a podstúpiť ďalšie cykly skladania, až kým nedosiahne svoj natívny stav. Rôznorodá škála ko-chaperónov umožňuje Hsp70 prijímať širokú škálu substrátových proteínov (Dragovic et al., 2006; Sable & Agarwal, 2018; Hu, et al., 2022).



Obr. 3: Konformačný cyklus heat shock proteínov 70 závislý na ATP. JDP - proteíny s J-doménou (z angl. J domain protein), NEF - faktor výmeny nukleotidov (z angl. nucleotide exchange factors). Prevzaté a upravené z Kohler & Andréasson, 2020.

2.2.3 Faktory tepelného šoku

Hsps sú kódované rôznymi génmi, ktoré sa nachádzajú v mnohých bunkových oddeleniach. Expresia Hsps je riadená a regulovaná transkripčnými faktormi označovanými ako faktory tepelného šoku (z angl. heat shock factors, Hsf), ktoré normálne existujú ako neaktívne proteíny (Wang et al., 2012; Hýsková, et al., 2021a). V blízkosti N-konca všetkých Hsf sa nachádza vysoko štruktúrovaná DNA viažuca doména (z angl. DNA-binding domain, DBD). DBD je tvorená trojzávitnicovým zväzkom (H1, H2 a H3) a štvorvláknovým antiparalelným β -listom. DBD je charakterizovaná centrálnym motívom helix-otočka-helix (H2-T-H3), ktorý sa špecificky viaže na elementy tepelného stresu (z angl. heat stress elements, HSE). HSE sú tvorené opakujúcimi sa vzormi palindromatických väzbových motívov pred TATA boxom eukaryotických génov indukovaných tepelným stresom. DBD je spojená s oligomerizačnou doménou (OD alebo HR-A/B oblasť) pomocou linkeru s premenlivou dĺžkou. Na základe dĺžky linkeru medzi DBD a oligomerizačnou doménou a počtu aminokyselinových zvyškov vložených do oblasti OD sa rastlinné Hsf delia do troch tried: HsfA, HsfB a HsfC (obr. 4) (Scharf et al., 2012; Guo et al., 2016).

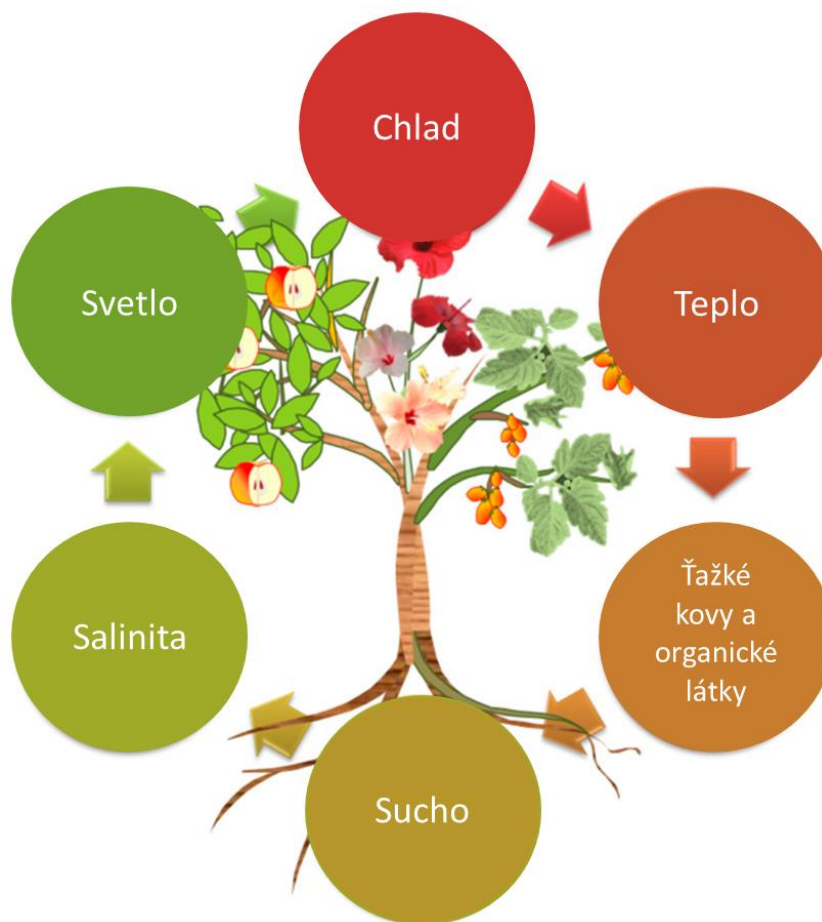


Obr. 4: Základná štruktúra faktorov tepelného šoku pre 5 paradajkových Hsf zarovnaných na začiatku DNA viažucej domény (DBD). Šípka znázorňuje polohu konzervovaného intrónu. OD – oligomerizačná doména, NLS – jadrový lokalizačný signál, NES – jadrový exportný signál, AHA – motív aktivátora, RD – represorová doména. Prevzaté a upravené z Scharf et al., 2012.

Trieda A Hsf má funkciu aktivátora transkripcie. V mnohých prípadoch sú pre funkciu aktivátora rozhodujúce krátke peptidové AHA motívy, ktoré charakterizujú C-terminálne aktivačné domény rastlinných Hsf. AHA motívy sú charakterizované aromatickými, veľkými hydrofóbnymi a kyslými aminokyselinovými zvyškami. Jadrový lokalizačný signál (z angl. nuclear localization signal, NLS) faktora tepelného šoku je tvorený jednodielnymi alebo dvojdielnymi zhlukmi bázičných aminokyselinových zvyškov C-konca oligomerizačnej domény. V Hsf triedy B, okrem HsfB5, pravdepodobne slúži ako jadrový lokalizačný signál, základný klaster spojený s vysoko konzervovaným tetrapeptidovým motívom, fungujúci ako represorová doména (RD). Jadrový exportný signál (z angl. nuclear export signal, NES) na C-konci mnohých Hsf je hydrofóbný a často bohatý na leucín. Spolu s priľahlými AHA motívami slúži NES ako súčasť typovo špecifickej signálnej oblasti na C-konci Hsf triedy A v rastlinách. V závislosti od rovnováhy jadrového importu a exportu sa vnútrobunková distribúcia Hsf dynamicky mení medzi jadrom a cytoplazmou (Scharf et al., 2012; Guo et al., 2016).

2.3 Typy stresov

Rastliny sú organizmy, ktoré svojím spôsobom života nemôžu zmeniť miesto pre vlastný vývoj, a preto sú ovplyvňované rôznymi biotickými a abiotickými faktormi. Medzi abiotické faktory patrí napríklad teplota, sucho, ožiarenie alebo pôdne faktory akými je zasolenie, prítomnosť ťažkých kovov, toxínov a oxidantov v dôsledku ľudskej činnosti. Biotickými faktormi môžu byť patogény alebo byľinožravce. Všetky tieto faktory (obr. 5) môžu na rastlinu pôsobiť naraz a viesť k vyvolaniu stresu. Takmer všetky druhy stresov indukujú v bunkách expresiu génov a syntézu Hsps (Al-Whaibi, 2011; Guo et al., 2016). Dané typy stresov, či už jednotlivo alebo v kombinácii, majú negatívne účinky na rast, vývoj, klíčenie rastlín, stratu fotosyntetického pigmentu, ale aj na zníženú produkciu fotoasimilátov. Následkom týchto stresov sa tvoria reaktívne formy kyslíka (ROS), ktoré môžu viesť k oxidačnému stresu a v konečnom dôsledku k bunkovej smrti (Ul Haq et al., 2019).



Obr. 5: Schéma potenciálnych abiotických stresov pôsobiacich na rastlinu. Prevzaté a upravené z Francini & Sebastiani, 2019.

Pri oxidačnom strese sa tvoria reaktívne formy kyslíka, ako je peroxid vodíka (H_2O_2), hydroxylové radikály (OH^\bullet), superoxid (O_2^-) a singletový kyslík (1O_2) nachádzajúce sa hlavne v mitochondriách, chloroplastoch a peroxizómoch, ale taktiež v bunkovej stene, bunkovej membráne alebo endoplazmatickom retikule. Vysoké koncentrácie ROS sú pre bunky škodlivé a majú za následok poškodenie, ktoré sa prejavuje degradáciou biomolekúl vrátane proteínov, lipidov, sacharidov, DNA a pigmentov, čo vedie k bunkovej smrti rastlín (Ul Haq et al., 2019; Aghaie & Tafreshi, 2020; Devi et al., 2023). ROS sú produkované ako normálne produkty bunkového metabolizmu. Avšak, jednou z hlavných príčin oxidačného stresu je produkcia peroxidu vodíka, ktorý sa premieňa zo superoxidu unikajúceho z mitochondrií. Akumulácia ROS môže znížiť odolnosť organizmov v dôsledku oxidačného poškodenia, ktoré môže ovplyvniť mitochondriálnu účinnosť a ďalej zvýšiť rýchlosť produkcie ROS (Firmansyah & Argosubekti, 2020).

2.3.1 Vysoká teplota

Teplota je jedným z kľúčových fyzikálnych parametrov, ktorý ovplyvňuje život na Zemi. Klimatické zmeny sprevádzané vysokými teplotami ohrozujú všetky organizmy, ale rastliny sú postihnuté najviac pre neschopnosť pohybu. Takmer všetky živé bunky si vyvinuli signálne dráhy snímajúce mierne zmeny okolitej teploty, podľa ktorých následne upravujú svoj metabolizmus a funkciu buniek, aby zabránili poškodeniu spôsobenému teplom. Vysoká teplota môže mať nepriaznivý vplyv na skoro všetky aspekty vývoja, rastu a rozmnožovania rastlín. Taktiež negatívne vplyva na stabilitu proteínov, membrán, štruktúru cytoskeletu a mení účinnosť enzýmových reakcií v bunke, čo spôsobuje nerovnováhu metabolického stavu. Ovplyvňuje aj fluiditu membrány a jej narušenie má za následok akumuláciu ROS (Mittler et al., 2012; Ul Haq et al., 2019). K zvýšenej produkcii Hsps dochádza buď pri postupnom zvýšení teploty alebo pri reakcii na náhle zvýšenie teploty o 5 – 10 °C (Firmansyah & Argosubekti, 2020).

2.3.2 Chlad

Stres vyvolaný chladom ovplyvňuje rastlinné enzýmy, plasticitu membrán, mení metabolizmus, čo vytvára pre rastlinu stresové podmienky, ktoré majú nepriaznivý vplyv na rast a vývoj. Nízka teplota (0 – 15 °C) je spájaná s dysfunkciou a denaturáciou proteínov, čo vyvoláva akumuláciu Hsps (Ul Haq et al., 2019). Zatiaľ čo krátke vystavenie nízkym teplotám môže vyvolať len prechodné zmeny, dlhodobé vystavenie chladu spôsobuje nekrózu alebo smrť rastlín (Szymańska et al., 2017). Nízke teploty môžu rastlinám vyvolať stres dvojakým spôsobom, a to samotnými účinkami nízkej teploty alebo dehydratáciou buniek a tkanív, keď voda v bunkách zamrzne (Beck et al., 2004). Reakcia rastlín na stres spôsobený nízkymi teplotami je dynamický proces, ktorý závisí od rôznych faktorov, akými sú vývojové štádium, trvanie a závažnosť stresu, rýchlosť ochladzovania a aj to či dochádza k tvorbe ľadu intracelulárne alebo extracelulárne (Janmohammadi et al., 2015). Vytvorenie ľadu v intracelulárnych priestoroch môže spôsobiť narušenie buniek a tkanív či denaturáciu bielkovín (Imran et al., 2021).

2.3.3 Sucho

Rozhodujúci a ohrozujúci abiotický faktor akým je sucho v súčasnosti ovplyvňuje produkciu mnohých plodín a je jednou z hlavných príčin strát na úrode po celom svete. V kombinácii s vysokou teplotou negatívne pôsobí na morfológické, fyziologické

a molekulárne charakteristiky rastlín, čo vedie k zníženiu fotosyntézy, nedostatku minerálnych živín výraznému poklesu klíčenia či zadržiavaniu vody. Sucho narúša normálny transport rozpustených látok, spôsobuje únik elektrónov a spúšťa produkciu ROS, čím dochádza k oxidačnému poškodeniu jadra, membránových lipidov, bielkovín, čo vedie k bunkovej smrti. Deficit vody vplýva aj na množstvo a kvalitu rastlinných bielkovín, v dôsledku čoho sa indukujú proteíny súvisiace so stresom vrátane Hsps (Hussain et al., 2019; Ul Haq et al., 2019; Aghaie & Tafreshi, 2020). Rast rastlín sa uskutočňuje delením buniek, ich zväčšením a rozdelením, avšak sucho zhoršuje mitózu a predlžovanie buniek, čo má za následok slabý rast. V podmienkach sucha sa znižuje aj počet a veľkosť jednotlivých listov (Fahad et al., 2017).

2.3.4 Salinita

Jedným z najdôležitejších globálnych problémov, ktorý negatívne ovplyvňuje produktivitu rastlín je zasolenie pôdy. Salinita zhoršuje rast a vývoj rastlín prostredníctvom vodného stresu, nutričnej nerovnováhy a cytotoxicity dôsledkom nadmerného príjmu iónov, ako sú ióny sodíka a chlóru. Okrem toho je zasolenie pôdy sprevádzané oxidačným stresom následkom tvorby ROS (Isayenkov & Maathuis, 2019). Salinita sa delí na primárnu a sekundárnu, pričom primárna je spôsobená nahromadením solí počas dlhého časového obdobia procesmi v pôde alebo podzemnej vode. Medzi prirodzené procesy patrí zvetrávanie materiálov obsahujúcich rozpustné soli alebo usadzovanie oceánskej soli, ktorá je prenášaná vetrom a dažďom. Sekundárna salinita je zapríčinená ľudskou činnosťou, ktorá mení hydrologickú rovnováhu pôdy medzi použitou vodou (zavlažovanie alebo zrážky) a vodou využívanou plodinami (Parihar et al., 2015).

Zvýšené množstvo solí v pôde bráni rastu rastlín, pretože ich prítomnosť znižuje schopnosť rastliny prijímať vodu, čo vedie k poklesu rýchlosti rastu. Taktiež, ak nadmerné množstvo soli vstúpi do rastliny v transpiračnom prúde, dôjde k poškodeniu buniek v transpiračných listoch, a to môže spôsobiť ďalšie obmedzenie rastu. Škodlivý účinok sa pozoruje na úrovni celej rastliny ako úhyn alebo zmenšenie produktivity. Soľný stres ovplyvňuje všetky hlavné procesy, ako je klíčenie, rast, fotosyntéza, fotosyntetické pigmenty, pomer vody, nerovnováha živín, oxidačný stres a výnos (Parihar et al., 2015).

2.3.5 Ťažké kovy

Prítomnosť ťažkých kovov v pôde obmedzuje rast rastlín buď vytesnením esenciálnych katiónov zo špecifických väzbových miest alebo vytváraním oxidačného stresu tvorbou ROS, ktoré narúšajú antioxidantné obranné systémy (Ul Haq et al., 2019; Kul et al., 2021). Ťažké kovy ako železo, mangán, meď, nikel, kobalt, kadmium, zinok, ortuť a arzén sa ľudskou činnosťou dlhodobo hromadia v pôde a sú klasifikované ako biologicky nerozložiteľné. Priemyselný odpad, hnojenie či likvidácia odpadových vôd spôsobujú vyplavovanie kovov do podzemných vôd alebo ich hromadenie na povrchu pôdy (Ghori et al., 2019; Kul et al., 2021). Pre životné prostredie sa stala hlavnou hrozbou toxicita kadmia, pretože ho rastliny ľahko absorbujú z pôdy a umožňujú mu vstup do potravinového reťazca. Kadmium vstupuje do rastlinných buniek cez membránovo viazané katiónové transportéry a narúša normálne bunkové funkcie tým, že nahradí zinok, vápnik a železo v proteínoch (Hossain et al., 2012a). Škodlivosť ťažkých kovov na bunkovej a molekulárnej úrovni vedie k zmenám fyziologických procesov rastlín, vrátane inaktivácie a denaturácie proteínov, narušenia bunkovej membrány, blokovania funkčných skupín dôležitých molekúl, čo má za následok zmenu metabolizmu, stratu fotosyntézy a dýchania (Hossain et al., 2012b).

2.4 Metódy detekcie heat shock proteínov 70

Hsp70 v rastlinách je možné detegovať pomocou rôznych metód. V práci Ireland et al. (2004) využili metódu ELISA, ktorá je podrobnejšie popísaná v kapitole 2.5. Polenta et al. (2020) vo svojom výskume použili na separáciu proteínov polyakrylamidovú gélovú elektroforézu v prítomnosti dodecylsírany sodného (z angl. SDS-PAGE) s následnou imunodetekciou Hsp70, ktoré sú viac rozpísané v kapitolách 2.6 a 2.8. Cazalé et al. (2009) využívali kvantitatívnu polymerázovú reťazovú reakciu s reverznou transkripciou (z angl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR). Pravdepodobne najdôležitejším krokom pri RT-qPCR je izolácia vzorky, pretože je nevyhnutné, aby neobsahovala žiadne kontaminanty, ktoré by mohli inhibovať reakciu. Najčastejšie sa na extrakciu využívajú komerčne dostupné kity pre extrakciu celkovej RNA, ktoré sú výhodne pre svoju jednoduchosť a časovú nenáročnosť (Adams, 2020). V bunke sú gény definované ako úseky DNA sekvencie, ktoré môžu byť prečítané a prepísané do messengerovej RNA (mRNA) pomocou určitých enzýmov. Tento proces sa nazýva transkripcia. V druhom kroku sa sekvencia mRNA prekladá do sekvencie aminokyselín.

Pri RT-qPCR sa mRNA najprv prepisuje späť do cDNA (reverzná transkripcia), a potom sa amplifikuje v niekoľkých cykloch polymerázovou reakciou. Použitím tzv. primerov špecifických pre danú sekvenciu sa proces amplifikácie obmedzí na určitú cieľovú sekvenciu zodpovedajúcu génu záujmu (z angl. gene of interest, GOI). Existujú dve varianty sledovanie amplifikácie úsekov DNA v reálnom čase. Používajú sa buď nešpecifické fluorescenčné DNA farbivá alebo fluorescenčne značené oligonukleotidové sondy, ktoré sú využívanéjšie. Po každom cykle sa meria fluorescencia a intenzita fluorescenčného signálu odráža momentálne množstvo amplikónov DNA vo vzorke v danom čase. V začiatkových cykloch je fluorescencia príliš nízka na to, aby sa dala odlíšiť od pozadia (Kralik & Ricchi, 2017; Krause et al., 2021).

U RT-qPCR je možné použiť dve stratégie kvantifikácie génov. Hladiny exprimovaných génov sa môžu merať pomocou absolútnej alebo relatívnej kvantifikácie. Absolútna kvantifikácia vzťahuje signál PCR na vstupný počet kópií pomocou kalibračnej krivky. Relatívna kvantifikácia určuje zmeny ustálených hladín mRNA génu vo viacerých vzorkách a vyjadruje ich vo vzťahu k hladinám vnútornej kontrolnej RNA. Daný referenčný gén (z angl. housekeeping gene) má stabilnú expresiu naprieč všetkými meranými vzorkami. Na výpočet expresie cieľového génu vo vzťahu k referenčnému génu sú vytvorené rôzne matematické modely. Výpočty sú založené na porovnávaní odlišného cyklu určeného rôznymi metódami ako napríklad prahovými hodnotami (z angl. threshold values) pri konštantnej úrovni fluorescencie (Pfaffl, 2004). Hodnoty fluorescencie sa zaznamenávajú počas každého cyklu a predstavujú množstvo produktu amplifikovaného do daného bodu amplifikačnej reakcie. Čím viac templátu je prítomného na začiatku reakcie, tým menší počet cyklov je potrebný na dosiahnutie bodu, v ktorom je fluorescenčný signál prvýkrát zaznamenaný ako štatisticky významný a odlišiteľný od pozadia. Tento bod je definovaný ako C_t hodnota (z angl. threshold cycle) a nastáva počas exponenciálnej fázy amplifikácie (Bustin, 2000).

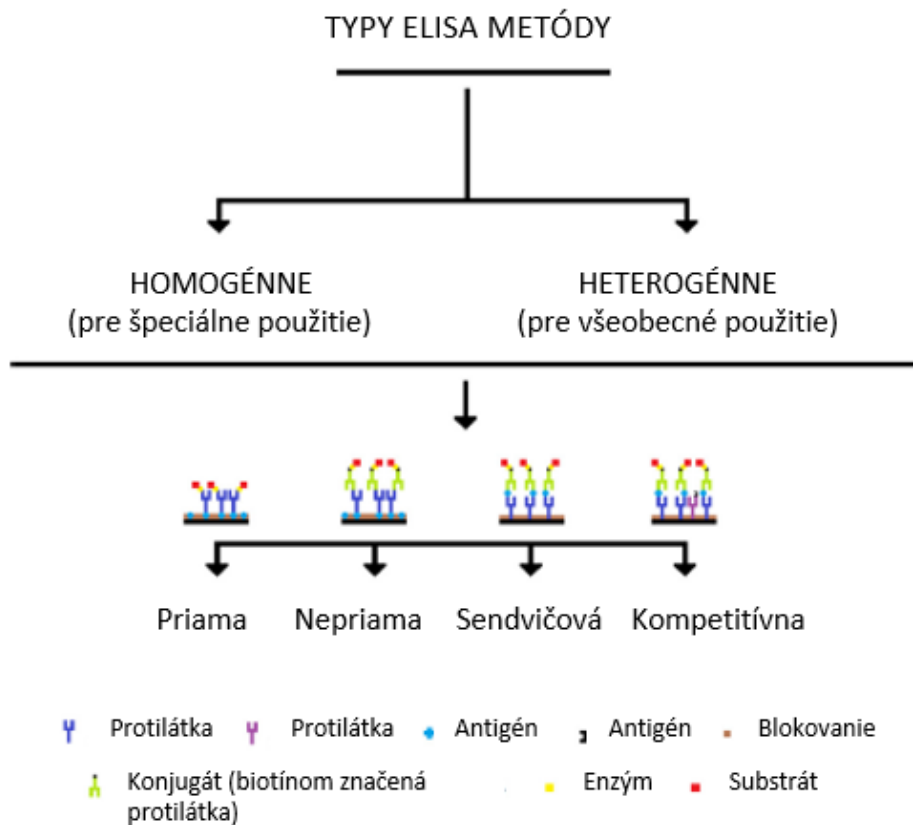
2.5 ELISA

Kvantitatívne analytické metódy zobrazujúce reakciu antigénu s protilátkou prostredníctvom farebnej zmeny získanej použitím detekčného enzýmu naviazaného na protilátke, sa vo všeobecnosti nazývajú enzýmové imunotesty. Dané metódy slúžia na identifikáciu prítomnosti a koncentrácie molekúl v biologických tekutinách. Medzi enzýmové imunotesty patrí enzýmová imunoanalýza (EIA) a enzýmová imunosorbčná analýza (ELISA). Molekuly s veľmi nízkou koncentráciou ako sú peptidy, proteíny, hormóny, vitamíny a liečivá, vykazujú vysokú mieru špecifity voči protilátkam alebo antigénom na ne vyvinutým (Suleyman, 2015).

Enzýmové imunotesty sa rozdeľujú do dvoch všeobecných kategórií: homogénne a heterogénne enzýmové imunoanalytické metódy. Pri homogénnych metódach enzýmovej imunoanalýzy sa enzýmy inaktivujú, keď sa naviažu na protilátku, a preto neexistuje fáza (premývanie), v ktorej sa antigén oddelí od média. Enzýmová aktivita značeného antigénu sa meria v prítomnosti značeného komplexu antigén-protilátka, ktorého enzýmová časť je stéricky inhibovaná. Zvyčajne sa používa na meranie látok v malých množstvách, ako sú terapeutické lieky. Pri heterogénnych enzýmových imunoanalytických metódach je potrebné, po naviazaní antigénu a protilátky, zabrániť interferencii akejkoľvek molekuly v médiu s ním. Preto sa komplex antigénu a protilátky viaže na steny skúmaviek a všetko ostatné, okrem komplexu, sa z média odstráni premývacími postupmi. Tým pádom je nevyhnutné mať v metódach heterogénnej enzýmovej imunoanalýzy premývací stupeň na oddelenie viazaného antigénu od voľného antigénu po interakcii antigén-protilátka. Keďže heterogénna metóda je citlivejšia ako homogénna, používa sa častejšie. Medzi heterogénne enzýmové imunotesty patrí aj metóda ELISA, ktorej rozdelenie je zobrazené na obrázku 6. Pri metóde EIA sú molekuly enzýmu konjugované so sekundárnymi (detekčnými) protilátkami, ktoré sa viažu na primárny komplex antigén-protilátka. Po pridaní vhodného substrátu enzým katalyzuje tvorbu konečného farebného produktu, ktorý možno vizualizovať a kvantifikovať. Najčastejšie používanými enzýmami sú AP alebo HRP (Clark & Engvall, 1980; Koivunen & Krogsrud, 2006; Suleyman, 2015).

Špecifické protilátky alebo antigény sa pri metóde ELISA kvantifikujú inkubáciou testovaných tekutín v skúmavkách či mikrodôštičkách potiahnutých antigénom alebo špecifickou protilátkou. Ďalší krok zahŕňa pridanie enzýmom označeného činidla (antiimunoglobulínu alebo špecifickej protilátky), ktoré po reakcii s komplexom

antigén-protilátka predstavuje základ pre konečnú vizualizáciu celkového komplexu, pomocou špecifického enzýmového substrátu (Bishai & Galli, 1978). Enzýmy, ktoré sa môžu použiť v ELISA zahŕňajú β -D-galaktozid galaktohydrolázu (β -galaktozidáza, β -gal, EC 3.2.1.23), β -D-glukóza:kyslík 1-oxidoreduktázu (glukozooxidáza, GOD, EC 1.1.3.4), NADH:vodík-peroxid oxidoreduktázu (peroxidáza, POD, EC 1.11.1.1), chrenovú peroxidázu a alkalickú fosfatázu (Suleyman, 2015).



Obr. 6: Typy ELISA metódy rozdelené na homogénne a heterogénne. Prevzaté a upravené zo Suleyman, 2015.

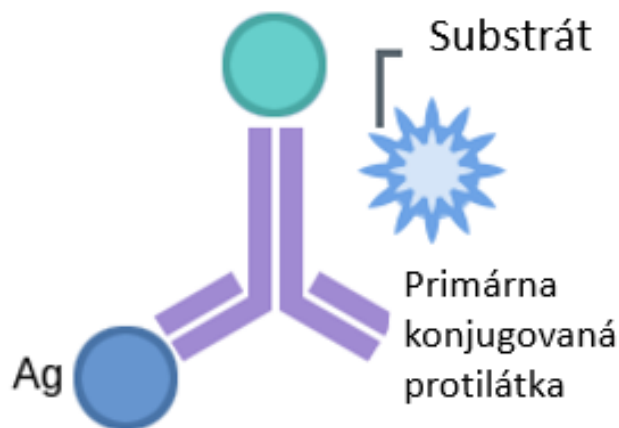
2.5.1 Typy ELISA metódy

ELISA je metóda používaná na detekciu špecifických protilátok a rozpustných antigénov. Keďže štruktúra a vlastnosti meraných látok nie sú vždy rovnaké, boli vyvinuté rôzne typy ELISA metód na zvýšenie špecifickosti merania. ELISA sa rozdeľuje na štyri hlavné typy, ktorými sú priama, nepriama, sendvičová a kompetitívna ELISA (Suleyman, 2015; Saangi, 2021).

2.5.1.1 Priama ELISA

Pri priamej ELISA metóde (obr. 7) sa antigén alebo vzorka pridá priamo na mikrodostičku, ktorá sa následne inkubuje. Po inkubácii sa mikrodostička premyje od prípadných neviazaných protilátok a dochádza k zablokovaniu všetkých nenaviazaných miest na mikrodostičke pomocou látok ako je hovädzí sérový albumín (BSA), ovalbumín, aprotinín alebo iné živočíšne bielkoviny. Premytie je dôležitým krokom, pretože zabraňuje naviazaniu akýchkoľvek nešpecifických protilátok na mikrodostičku a minimalizuje falošne pozitívne výsledky. Po pridaní pufru sa mikrodostička znovu premyje a pridá sa vybraná primárna detekčná protilátka konjugovaná s enzýmom, ktorá sa viaže na cieľový proteín. Potom sa doštička znovu premyje, aby sa odstránili všetky nenaviazané protilátky a nasleduje pridanie substrátu/chromofóru. Ako substrát/chromofór sa využíva AP alebo HRP, čo vedie k zmene farby. Zmena farby vzorky nastáva buď hydrolýzou fosfátových skupín zo substrátu pomocou AP, alebo oxidáciou substrátov pomocou HRP (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

Výhodami použitia priamej ELISA metódy je eliminácia skríženej reaktivity sekundárnych protilátok, a vďaka menšiemu počtu krokov je rýchla v porovnaní s nepriamou ELISA metódou. Medzi jej nevýhody patrí tiež nízka citlivosť v porovnaní s ostatnými typmi ELISA metód a vysoká cena reakcie. Priama ELISA využíva len jednu protilátku, a preto je menej špecifická ako sendvičová ELISA (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023). Je vhodná na kvalitatívnu analýzu makromolekúl (Sakamoto et al., 2018).

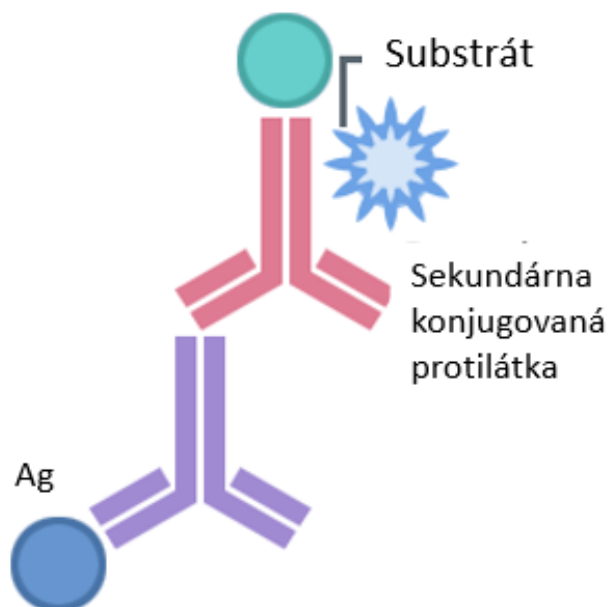


Obr. 7: Schéma priebehu priamej ELISA metódy. Ag – antigén. Prevzaté a upravené z <https://theory.labster.com/types-elisa/>.

2.5.1.2 Nepriama ELISA

Nepriama ELISA (obr. 8) je podobná priamej ELISA metóde, pretože antigén je imobilizovaný na mikrodoštičke. Rozdielom je dodatočné premytie a typy protilátok pridaných po odstránení pufru. Nepriama ELISA vyžaduje dve protilátky. Primárnu detekčnú protilátku, ktorá sa prilepí na proteín záujmu a sekundárnu enzýmovo viazanú protilátku, komplementárnu k primárnej protilátke. Najskôr sa pridá primárna protilátka, ktorá sa viaže na špecifický antigén. Nasleduje premývací krok a pridanie konjugovanej sekundárnej protilátky namierenej proti hostiteľskému druhu primárnej protilátky. Potom sú kroky rovnaké ako pri priamej ELISA metóde zahŕňajúcej premývací krok, pridanie substrátu, ktorý produkuje signál úmerný množstvu naviazaného antigénu v jamke a deteguje sa zmena farby (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

Nepriama ELISA má vyššiu citlivosť v porovnaní s priamou ELISA metódou. Je tiež lacnejšia a flexibilnejšia vďaka množstvu možných primárnych protilátok, ktoré možno použiť. Jedinou väčšou nevýhodou tohto typu ELISA metódy je riziko skříženej reaktivity medzi sekundárnymi detekčnými protilátkami (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

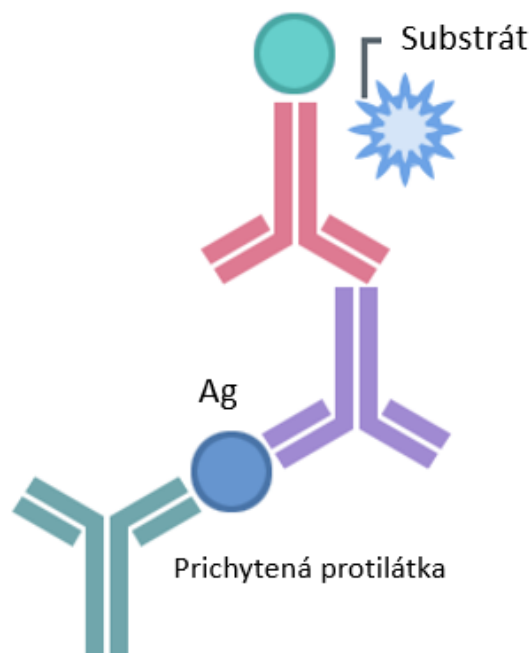


Obr. 8: Schéma priebehu nepriamej ELISA metódy. Ag – antigén. Prevzaté a upravené z <https://theory.labster.com/types-elisa/>.

2.5.1.3 Sendvičová ELISA

Sendvičová ELISA (obr. 9) je najbežnejším typom ELISA metódy. Začína imobilizáciou protilátky, nazývanej zachytávacia protilátka nanesenou na jamky mikrodoštičky. Označuje sa ako "sendvičová", pretože antigény sú vložené medzi dve vrstvy protilátok (zachytávacie a detekčné protilátky). Po pridaní zachytávacej protilátky sa mikrodoštička inkubuje určitý čas, následne sa premyje fosfátovým pufrom (z angl. phosphate buffered saline, PBS) a potom sa blokuje BSA. Nakoniec sa mikrodoštička pred pridaním antigénu ešte raz premyje PBS. Pridá sa antigén, ktorý sa naviaže na zachytávaciu protilátku a znovu sa inkubuje. Mikrodoštička sa premyje, pridá sa na ňu primárna detekčná protilátka, ktorá sa viaže na ďalší epitop na cieľovom proteíne, a nasleduje inkubácia s premytím. Po premytí sa pridá sekundárna protilátka konjugovaná s enzýmom a znovu sa inkubuje. Mikrodoštička sa opäť premyje a pridá sa substrát, ktorý vytvorí signál úmerný množstvu analytu prítomného vo vzorke (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

Sendvičová ELISA má najvyššiu citlivosť spomedzi všetkých typov ELISA metód. Hlavnou nevýhodou tohto typu ELISA metódy je časová a finančná náročnosť, avšak je vysoko špecifická, pretože na naviazanie sa na proteín sú potrebné dve protilátky (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

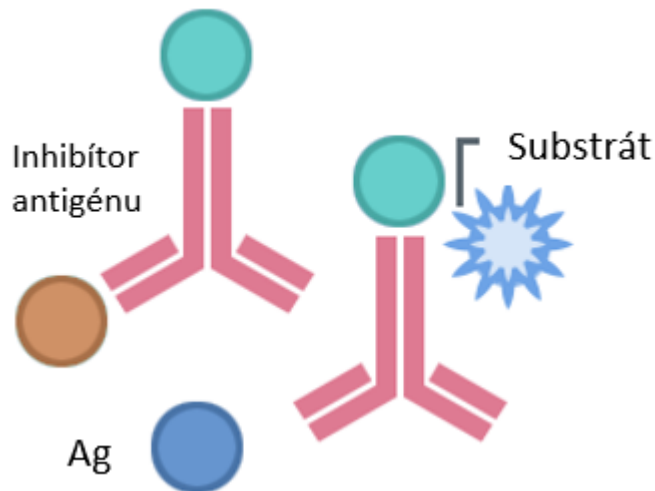


Obr. 9: Schéma priebehu sendvičovej ELISA metódy. Ag – antigén. Prevzaté a upravené z <https://theory.labster.com/types-elisa/>.

2.5.1.4 Kompetitívna ELISA

Kompetitívna ELISA (obr. 10) testuje prítomnosť protilátky špecifickej pre antigény v testovanom sére. Bežne sa používa na malé molekuly, keď je proteín záujmu príliš malý na to, aby sa dal účinne spojiť s dvoma protilátkami. Tento typ ELISA metódy využíva dve špecifické protilátky, protilátku konjugovanú s enzýmom a ďalšiu protilátku prítomnú v testovanom sére. Kombinácia týchto dvoch protilátok v jamkách umožní súťaž (kompetíciu) o väzbu na antigén. Namiesto použitia konjugovanej detekčnej protilátky sa používa konjugovaný antigén, aby sa dokončila väzba s antigénom prítomným vo vzorke. Čím viac antigénov je prítomných vo vzorke, tým menej konjugovaného antigénu sa viaže na zachytenú protilátku. To znamená, že so zvyšujúcim sa množstvom cieľového antigénu sa signál znižuje. Pridá sa substrát a vytvorený signál je nepriamo úmerný množstvu proteínu prítomného vo vzorke. Ak po pridaní substrátu dôjde k farebnej zmene, znamená to, že test je negatívny, pretože protilátka konjugovaná s enzýmom naviazala antigény (nie protilátky testovacieho séra). Neprítomnosť farby znamená pozitívny test a prítomnosť protilátok v testovanom sére (Sakamoto et al., 2018; Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).

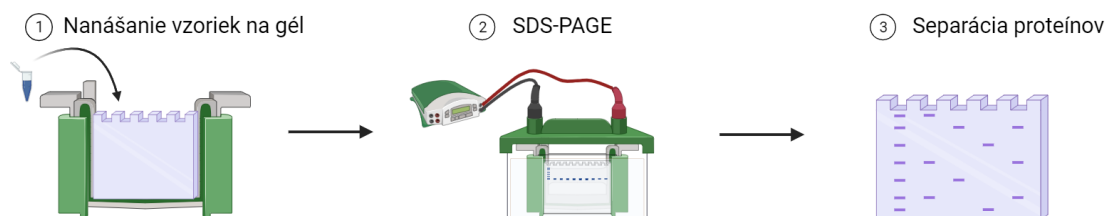
Kompetitívna ELISA má nízku špecifitu a nemôže sa použiť v zriedených vzorkách. Medzi jej výhody možno zaradiť nízku variabilitu, nižšie množstvo potrebných premývacích krokov pre vzorky, možnosť merať veľký rozsah antigénov v danej vzorke, a rovnako možnosť použitia na malé antigény (Saangi, 2021; Alhajj et al., 2023).



Obr. 10: Schéma priebehu kompetitívnej ELISA metódy. Ag – antigén. Prevzaté a upravené z <https://theory.labster.com/types-elisa/>.

2.6 Elektroforéza SDS-PAGE

SDS-PAGE sa používa ako štandardný nástroj na analýzu proteínov v laboratóriách po celom svete od roku 1970, kedy ju zaviedol Laemmli (Hagiwara, 2022). Metóda (obr. 11) je zameraná na separáciu proteínov na základe ich schopnosti pohybovať sa v elektrickom poli vzhľadom na ich molekulovú hmotnosť a dĺžku polypeptidových reťazcov. Postup zahŕňa počiatočnú denaturáciu proteínov pomocou aniónového detergentu dodecylsírany sodného (SDS), ktorý sa zároveň na ne viaže a dodáva všetkým proteínom rovnaký záporný náboj úmerný ich molekulovej hmotnosti. Následne prebieha elektroforéza cez akrylamidový gél, vďaka ktorému sa proteíny oddeľujú s vynikajúcim rozlíšením na základe ich veľkosti. Akrylamidový gél sa vytvára polymerizáciou akrylamidu (AA) s priečnym spojivom N, N'-metylenbisakrylamidom (BIS) v prítomnosti katalyzátora N, N, N', N'-tetrametyletylendiaminu (TEMED) a iniciátora persírany amónneho (APS) za prítomnosti vhodného gélového pufru. Rýchlosť polymerizácie gélu sa dá regulovať zmenou koncentrácie TEMED a APS (Nowakowski et al., 2014; Roy & Kumar, 2014). Pri elektroforéze sa využívajú dva typy gélov: deliaci a zaoštrovací. Zaoštrovací gél je mierne kyslý (pH 6,8) a má nižšiu koncentráciu akrylamidu, čo vytvára porézny gél, ktorý zle oddeľuje bielkoviny, ale umožňuje im vytvoriť tenké, ostro ohraničené pásy. Deliaci gél je zásaditý (pH 8,8) a má vyšší obsah polyakrylamidu, vďaka čomu sú póry gélu užšie. Bielkoviny sa tak v tomto géle viac separujú podľa veľkosti, pretože menšie bielkoviny sa pohybujú ľahšie, a teda aj rýchlejšie, ako väčšie bielkoviny (Mahmood & Yang, 2012).

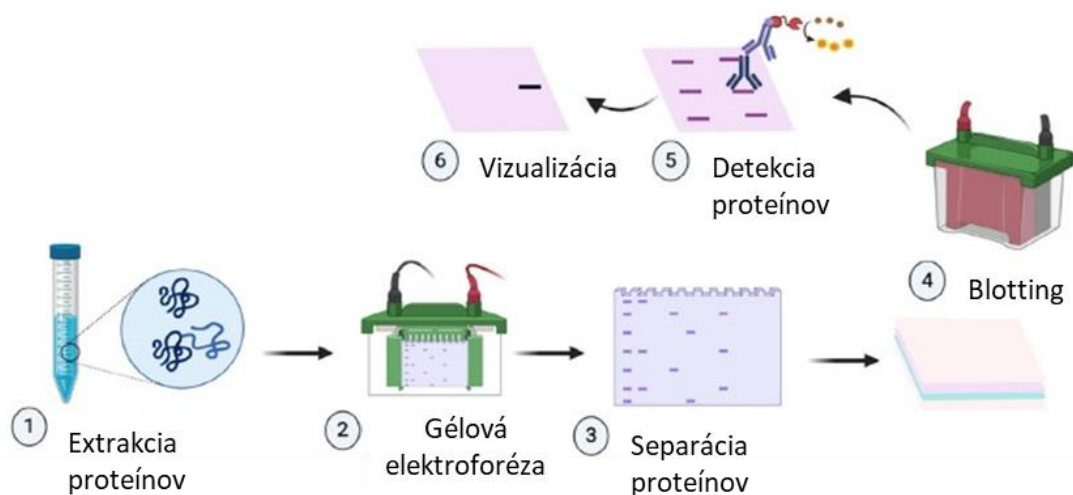


Obr. 11: Schematický postup polyakrylamidovej gélovej elektroforézy v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Po príprave a stuhnutí gélov sú nanosené vzorky (1). V priebehu SDS-PAGE sú proteíny separované podľa veľkosti (2 a 3). Vytvorené pomocou programu BioRender.

2.7 Western blotting

Western blotting (obr. 12), tiež aj imunoblot, je najbežnejšia analytická metóda, pri ktorej sú na membránu prenášané separované proteíny, čo umožňuje odhadnúť ich prítomnosť, molekulovú hmotnosť a relatívne množstvo (Moritz, 2020). V porovnaní s difúznym alebo vákuovým prenosom je jeho výhodou hlavne rýchlosť a úplnosť prenosu. Pri prenose z polyakrylamidového gélu sa môže použiť nitrocelulózová alebo polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána. Aby bol umožnený účinný prenos, gél a membrána musia mať sendvičové usporiadanie. Membrána sa umiestni medzi gél a kladnú elektródu, pričom sa na každej strane nachádzajú filtračné papiere na ochranu gélu a blotovacej membrány. Prenos sa uskutočňuje pomocou elektrického prúdu, ktorý pôsobí kolmo na povrch gélu, čo má za následok, že sa proteíny prenesú z gélu na membránu a viažu sa nekovalentnými väzbami. Prenos proteínov je možné dosiahnuť buď celým ponorením gélového membránového sendviča do pufri – mokrý prenos (z angl. wet transfer) alebo umiestnením gélového membránového sendviča medzi filtračný papier namočený v pufri – polosuchý prenos (z angl. semi-dry transfer). Pre väčšie bielkoviny sa odporúča mokrý prenos (Kurien & Scofield, 2006; Mahmood & Yang, 2012; Roy & Kumar, 2014; Sule et al., 2023).

Najčastejšie používanou membránou na prenos je nitrocelulózová membrána, ktorej nevýhodou je to, že proteíny sa neviažu kovalentne a v suchom stave je krehká. Malé proteíny majú tendenciu sa pohybovať cez nitrocelulózu a len malá časť z celkového množstva sa viaže. Na rozdiel od nitrocelulózovej membrány, PVDF membrána je vhodnejšia z dôvodu vysokej kapacity viazania proteínov fyzikálnej sily a chemickej stability (Kurien & Scofield, 2006).



Obr. 12: Pracovný postup Western blottingu. Izolované proteíny (1) sa najprv separujú podľa veľkosti pomocou gélovej elektroforézy (2 a 3). Oddelené proteíny sa následne prenesú na nitrocelulóзовú alebo PVDF blotovaciu membránu pomocou blottingu (4). Po prenose sa membrána inkubuje s primárnou a konjugovanou sekundárnou protilátkou kvôli detekcii proteínov (5). Nakoniec, v závislosti od použitej sekundárnej protilátky, sa cieľový proteín deteguje kolorimetrickými, fluorescenčnými alebo luminiscenčnými metódami (6). Prevzaté a upravené z Meftahi et al., 2021.

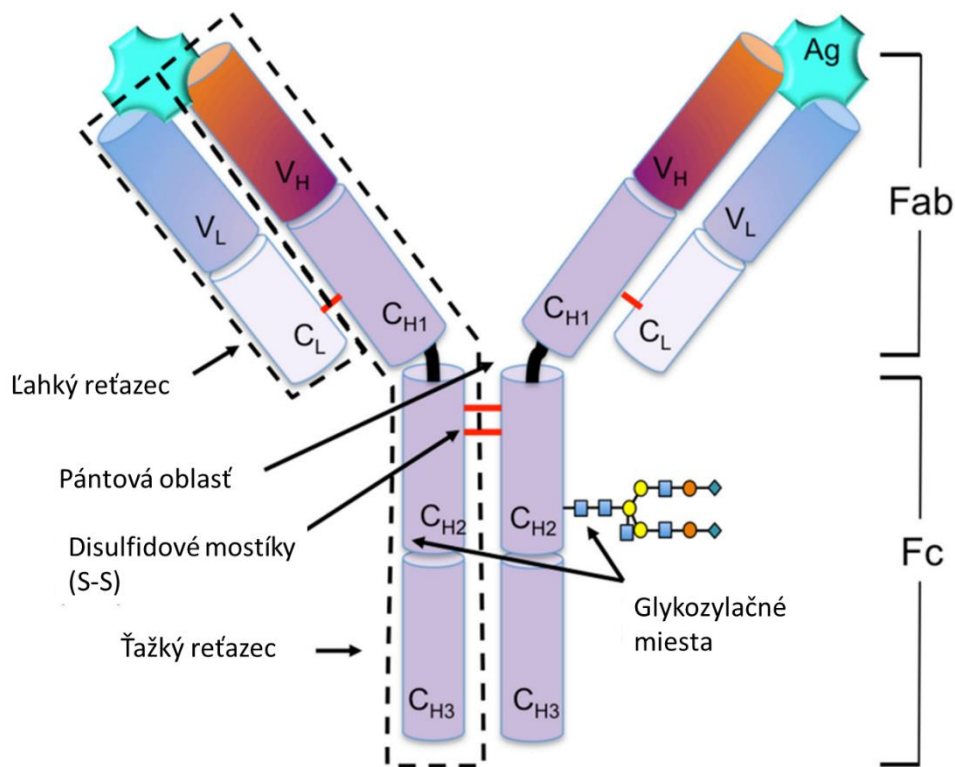
2.8 Imunodetekcia

Proteíny prenesené na membránu pomocou blottingu je možné vizualizovať reakciou s primárnou protilátkou, a následne značenou sekundárnou protilátkou proti izotypu primárnej protilátky, ktorá je naviazaná na požadovaný proteín. Na detekciu je možné použiť rádioaktívne, fluorescenčné či kolorimetrické metódy. Rádioaktívna detekcia je populárna kvôli nízkemu limitu detekcie, čo umožňuje dobré signály pre slabo exprimované proteíny. Pri použití fluorescenčnej detekcie musí byť sekundárna protilátka konjugovaná s fluorescenčným farbivom. Chromogénna detekcia funguje vďaka chemickým reakciám spúšťaným enzýmami konjugovanými s primárnymi alebo sekundárnymi protilátkami. K blotu sa pridá chromogénny substrát, ktorý sa predtým inkuboval s protilátkou konjugovanou s enzýmom (typicky chrenová peroxidáza), ktorý premení substrát na farebnú zrazeninu. Precipitát je viditeľný voľným okom a na detekciu nie je potrebné špeciálne vybavenie. Chemiluminiscenčná detekcia patrí medzi najbežnejšie používané metódy pri blottingu. Pri chemiluminiscenčnej detekcii sa primárna protilátka viaže na testovaný proteín a sekundárna protilátka je značená chrenovou peroxidázou. HRP katalyzuje oxidáciu luminolu (substrátu) v prítomnosti peroxidu na 3-aminoftalát, čo vedie k emisii svetla pri vlnovej dĺžke 425 nm. Produkt

reakcie produkuje luminiscenciu, ktorá je relatívna k množstvu detekovaného proteínu. Kolorimetrická detekcia má ľahké použitie. Široko používaným súborom chromogénnych substrátov pre alkalickú fosfatázu je 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP) a nitrotetrazoliová modrá (z angl. nitro blue tetrazolium, NBT). Po katalýze alkalickou fosfatázou, produkt BCIP ďalej reaguje s NBT za vzniku nerozpustnej tmavomodrej až fialovej zrazeniny (Lipman et al., 2005; Sule et al., 2023).

2.8.1 Štruktúra a funkcia protilátky

Protilátky sú glykoproteíny, označované tiež ako imunoglobulíny, pretože obsahujú spoločnú štruktúrnú doménu nachádzajúcu sa v mnohých proteínoch. Produkujú ich diferencované B lymfocyty v reakcii po vystavení antigénom. Molekuly v tvare Y sú identifikované ako imunoglobulíny G (IgG) s molekulovou hmotnosťou okolo 150 kDa. Ich zloženie pozostáva zo štyroch polypeptidov - dvoch identických kópií ťažkého reťazca (50 kDa) a dvoch kópií ľahkého reťazca (25 kDa) vzájomne spojených disulfidovými mostíkmi, ktoré zabezpečujú stabilitu ťažkých a ľahkých reťazcov vedľa seba (obr. 13). Ľahký reťazec pozostáva z variabilnej ľahkej (V_L) a konštantnej ľahkej (C_L) oblasti. Ťažký reťazec sa skladá z jedného V_H (variabilného ťažkého) reťazca spojeného s tromi konštantnými oblasťami (C_{H1} , C_{H2} a C_{H3}). Hlavnými funkčnými zložkami protilátky sú dva fragmenty antigén viažucej domény (z angl. Fragment antigen binding domains, Fab) a kryštalizovateľný fragment (z angl. Fragment crystallizable, Fc). Fragmenty Fab a Fc sú spojené pántovou oblasťou, ktorá umožňuje Fab veľkú mieru konformačnej flexibility vzhľadom na Fc. To uľahčuje väzbu Fab na viaceré ciele a umožňuje Fc nezávisle interagovať s inými zložkami imunitného systému. Každý Fab má identické antigénové väzobné miesta na väzbu protilátky so špecifickým cieľovým antigénom, čo prispieva k priamym účinkom protilátky ako je inhibícia alebo neutralizácia antigénu. Fc fragment obsahuje glykolyzačné miesta, ktoré sa viažu na rôzne receptorové molekuly a poskytujú profil efektorovej funkcie, ktorý určuje triedu protilátky a jej funkčné vlastnosti a aj to ako protilátka interaguje s ostatnými zložkami imunitného systému. Existuje päť tried protilátok vrátane IgG, IgM, IgD, IgE a IgA s odlišnými efektorovými mechanizmami na rozpoznávanie a elimináciu antigénov (Lipman et al., 2005; Murphy et al., 2016; Chiu et al., 2019; Sadeghalvad & Rezaei, 2021).



Obr. 13: Typická molekula IgG pozostávajúca zo štyroch polypeptidových reťazcov - dva ťažké reťazce a dva ľahké reťazce, ktoré sú spojené disulfidovými mostíkmi (znázornené červenou farbou). Ľahký reťazec pozostáva z variabilnej ľahkej (V_L) a konštantnej ľahkej (C_L) oblasti. Ťažký reťazec pozostáva z jedného V_H (variabilného ťažkého) reťazca spojeného s tromi konštantnými oblasťami (C_{H1}, C_{H2} a C_{H3}). Fc oblasť je dôležitá pre sprostredkovanie efektorových funkcií imunitného systému a Fab oblasť viaže antigén. Prevzaté a upravené z Murphy et al., 2016.

2.8.2 Monoklonálne a polyklonálne protilátky

Protilátky rozpoznávajú epitopy rôznej veľkosti a môžu ich viazať pomocou oblasti určujúcej komplementaritu (z angl. complementarity-determining region, CDR). Väzba epitopu na protilátku je reverzibilná a závisí od presnej konfigurácie protilátka-antigén. Vysoká špecifickosť a rôznorodosť protilátok z nich urobili populárne molekuly s veľmi vysokou účinnosťou v niekoľkých terapeutických alebo diagnostických aplikáciách. Monoklonálne protilátky (z angl. monoclonal antibody, mAb) sú skupinou protilátok produkovaných identickými klonmi B lymfocytov proti konkrétnemu antigénu. Monoklonálne protilátky sú rovnaké v niekoľkých vlastnostiach ako je napríklad oblasť miesta viažuceho antigén, väzbová afinita k svojim cieľom, proteínová sekvencia a identické následné funkčné účinky. Tieto charakteristiky mAb zdôrazňujú ich rozdiely s polyklonálnymi protilátkami (z angl. polyclonal antibody, pAb), ktoré obsahujú mnoho

odlišných molekulárnych druhov protilátok a rozpoznávajú rôzne epitopy na antigéne. Polyklonálne protilátky sú stabilnejšie pri širokom pH a koncentrácií solí, zatiaľ čo mAb môžu byť vysoko citlivé na malé zmeny v oboch prípadoch (Lipman et al., 2005; Sadeghalvad & Rezaei, 2021).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Rastlinný materiál

Rastlinný materiál predstavovali semená kultúrnych hrachov – *Pisum sativum*, konkrétne sa jednalo o tri genotypy: Arkta, Arvika a Trendy. Odrody Arkta a Arvika sú krmné hrachy, zatiaľ čo odroda Trendy je klasický záhradný hrach. Okrem toho, Arkta patrí medzi ozimnú odrodu. Pre označenie genotypov sú ďalej v práci používané skrátené názvy Arkta, Arvika a Trendy. Všetky semená boli poskytnuté firmou Selgen a.s.

3.2 Použité protilátky

Primárne protilátky :

- Monoklonálna protilátka Anti-Heat Shock Protein 70, protilátka produkovaná v myši, (H5147) – Merck, USA; <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/355/029/h5147dat.pdf>
- Polyklonálna protilátka Hsp70 – Heat shock protein 70 (cytoplazmatická) protilátka produkovaná v zajacovi, (AS 08371) – Agrisera, Švédsko; https://www.agrisera.com/cgi-bin/ibutik/SkapaFaktura.pl?SkrivPDF=J&Sprak=EN&Friendly_Grupp=heat-shock&funk=visa_artikel&artgrp=57&Friendly=hsp70-heat-shock-protein-70-cytoplasmic&skrivpdf=j&artnr=AS08%20371

Sekundárne protilátky:

- Anti-myšia IgG (Fc špecifická) značená alkalickou fosfatázou – protilátka produkovaná v koze, (A1418) – Sigma-Aldrich, USA – používaná pre Western blot
- Anti-zajačia IgG (celá molekula) značená alkalickou fosfatázou – protilátka produkovaná v koze, (A3687) – Sigma-Aldrich, USA – používaná pre Western blot
- Anti-zajačia IgG (celá molekula) značená peroxidázou – protilátka produkovaná v koze, (A0545) – Sigma-Aldrich, USA – používaná pre ELISA metódu

3.3 Použité chemikálie

- 3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidín dihydrochlorid (TMB) – ROTH, Nemecko
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP) – ROTH, Nemecko

- Akrylamid (AA) – Sigma-Aldrich, USA
- Bromfenolová modrá – Sigma-Aldrich, USA
- Dihydrogenfosforečnan amónny – Penta, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný – Sigma-Aldrich, USA
- Dihydrogenfosforčnan sodný hydrát – Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Česká republika
- Dimetylformamid (DMF) – Sigma-Aldrich, USA
- Dimetylsulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich, USA
- Disodná soľ kyseliny etyléndiamíntetraoctovej – Millipore, Nemecko
- Dodecylsírán sodný (SDS) – ROTH, Nemecko
- Dusičnan draselný – Lachema, Česká republika
- Dusičnan vápenatý tetrahydrát – Lachema, Česká republika
- Etanol – Penta, Česká republika
- Glycerol – Sigma-Aldrich, USA
- Glycín – Sigma-Aldrich, USA
- Hovädzí sérový albumín (BSA) – Sigma-Aldrich, USA
- Hydrogenfosforečnan draselný – Sigma-Aldrich, USA
- Hydrogenfosforečnan sodný – Sigma-Aldrich, USA
- Hydrogenuhličitan sodný – Lach-Ner, Česká republika
- Hydroxid sodný – Penta, Česká republika
- Chlorid draselný – Lachema, Česká republika
- Chlorid horečnatý – Lach-Ner, Česká republika
- Chlorid sodný – Penta, Česká republika
- Kyselina boritá – ROTH, Nemecko
- Kyselina citrónová – Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková – Lach-Ner, Česká republika
- Kyselina sírová – Lach-Ner, Česká republika
- Merkaptoetanol – ROTH, Nemecko
- Metanol – Sigma-Aldrich, USA
- Molybdenan amónny tetrahydrát – Sigma-Aldrich, USA
- Nitrotetrazoliová modrá (NBT) – ROTH, Nemecko
- n-butanol – Sigma-Aldrich, USA

- N, N'-metylénbisakrylamid (BIS) – Sigma-Aldrich, USA
- N, N, N', N'-tetrametyletyléndiamín (TEMED) – ROTH, Nemecko
- Perborát sodný – Merck, Slovinsko
- Persíran amónny (APS) – Sigma-Aldrich, USA
- Síran horečnatý heptahydrát – ROTH, Nemecko
- Síran manganatý hydrát – Sigma-Aldrich, USA
- Síran meďnatý pentahydrát – Sigma-Aldrich, USA
- Síran zinočnatý heptahydrát – Penta, Česká republika
- Síran železnatý heptahydrát – Penta, Česká republika
- Sušené mlieko – ROTH, Nemecko
- Tris/HCl pufor – Acros Organics, Belgicko
- Tween 20 – ROTH, Nemecko
- Uhličitan sodný – Lach-Ner, Česká republika
- Živočišny štandard Hsp70 z hovädzieho mozgu (H9776) – Sigma-Aldrich, USA

3.4 Použité prístroje a experimentálne vybavenie

- 96-jamková ELISA doštička Corning Costar – Sigma-Aldrich, USA
- Akvárijný motorček – Tetra, Nemecko
- Analytické váhy – Denver Instrument, USA
- Blotovacia aparátúra na semi-dry – BioRad, USA
- Centrifúga 5418R – Eppendorf, Nemecko
- Elektroforetická sada – BioRad, USA
- ImmunoPlate F96 Nunc, Maxisorp – Thermo Fisher Scientific, USA
- Magnetická miešačka – BioSan, Lotyšsko
- Sada automatických pipiet – Eppendorf, Nemecko
- Termostat – Major Science, Taiwan
- Termostatovaná trepačka – BioSan, Lotyšsko
- Trepačka – BioSan, Lotyšsko
- Vortex – BioSan, Lotyšsko
- Zdroj prúdu – Cleaver Scientific Ltd, Spojené kráľovstvo

3.5 Zloženie a príprava roztokov

- Vzorkovací pufo – 0,125 mol·l⁻¹ Tris/HCl pufo o pH 6,8; 4% (w:v) SDS, 20% (v:v) glycerol, 5% (v:v) merkaptoetanol a 0,02% (w:v) bromfenolová modrá
- Roztok „R“ – 1 diel 0,1 mol·l⁻¹ Tris/HCl pufru o pH 7, 1 diel vzorkovacieho pufru a 1 diel 10% (w:v) SDS
- Blokovací pufo – 5% (w:v) roztok sušeného mlieka v TBS (20 mmol·l⁻¹ Tris a 500 mmol·l⁻¹ chlorid sodný, pH 7)
- Roztok Tweenu 20 v TBS – 20 mmol·l⁻¹ Tris a 500 mmol·l⁻¹ chlorid sodný, pH 7 (objem 600 ml) + Tween 20 o objeme 300 µl
- „Staining“ pufo – 100 mmol·l⁻¹ Tris pufo, 100 mmol·l⁻¹ chlorid sodný a 5 mmol·l⁻¹ chlorid horečnatý, pH 9,5
- Farbiaci roztok – „staining“ pufo, NBT (10% (w:v) NBT v 70% (v:v) DMF), BCIP (5% BCIP (w:v) v 100% (v:v) DMF). 5 ml „staining“ pufru zmiešať s 16 µl roztoku NBT a 16 µl roztoku BCIP
- Uhličitanový pufo – 1,272 g uhličitan sodný a 1,512 g hydrogenuhlíčan sodný, rozpustiť v 250 ml destilovanej vody, upraviť pH, doplniť na objem 300 ml; použité pH 7,5; 9,6 a 10,5; výsledná koncentrácia uhličitanového pufru bola 0,1 mol·l⁻¹
- K-fosfátový pufo – 1 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan draselný a 1 mol·l⁻¹ dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7; výsledná koncentrácia K-fosfátového pufru bola 0,1 mol·l⁻¹
- 10x koncentrovaný premývací pufo o pH 7,5 – 1,5 mol·l⁻¹ chlorid sodný, 0,03 mol·l⁻¹ dihydrogenfosforečnan sodný hydrát a 0,01 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný
- Premývací pufo – 50 ml 10x koncentrovaného premývacieho pufru zmiešať s 500 µl Tween 20 a pridať 450 ml destilovanej vody
- Blokačné činidlá – použité 2% (w:v) BSA; 2% (w:v) BSA + 0,02% (v:v) Tween 20; 0,5% (w:v) mlieko a 0,5% mlieko (w:v) + 0,02% (v:v) Tween 20
- Fosfo-citrátový pufo – 0,2 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný, 0,1 mol·l⁻¹ kyselina citrónová a 4,89 mmol·l⁻¹ perborát sodný, pH 4,6
- Roztok TMB – 24 mg TMB v 1 ml DMSO
- ELISA substrát – 0,1 mol·l⁻¹ TMB a 0,1 mol·l⁻¹ fosfo-citrátový pufo s perborátom sodným o pH 4,6

3.6 Metódy

3.6.1 Pestovanie rastlinného materiálu

3.6.1.1 Rastlinný materiál I.

Rastlinný materiál I. bol pestovaný pre stanovenie Hsp70 metódou SDS-PAGE (kap. 4.1 a 4.4.2). Semená hrachu Trendy a Arvika boli ponechané počas jedného dňa v kadičkách s vodou, kde sa nechali nabobtnať pri izbovej teplote 25 °C. Na druhý deň boli semená premiestnené na Petriho misky. Do každej Petriho misky boli vložené vodou zvlhčené servítky a následne boli na ne poukladané semená hrachu. Semená sa ponechali klíčiť vo fytotrone po dobu dvoch dní pri teplote 23 °C s fotoperiódou 16 hodín svetlo a 8 hodín tma.

Po dvoch dňoch boli naklíčené semená hrachu z Petriho misiek premiestnené na pestovanie v hydroponickom systéme. Pri pestovaní bol pripravený živný Hoaglandov roztok podľa tabuľky 1, riedený v pomere 1:3 s vodou a prevzdušňovaný pomocou akvárijného motorčeka. Po siedmich dňoch bol rastlinný materiál vystavený stresovým podmienkam. Polovica rastlín slúžila ako kontrola, ktorá bola ponechaná 2 hodiny pri izbovej teplote 25 °C a druhá polovica bola vložená do termostatu s teplotou 42 °C na dve hodiny. Následne boli zozbierané zvlášť korene a nadzemné časti kontrolných aj stresovaných rastlín a materiál bol zamrazený pre ďalšie použitie.

Tab. 1: Zloženie Hoaglandovho roztoku.

Chemikálie	Koncentrácia zásobného roztoku (mmol·l ⁻¹)	Navážka (g·l ⁻¹)	Objem (ml·l ⁻¹)	Výsledná koncentrácia (μmol·l ⁻¹)
KNO ₃	1000	101,2	1,5	1,5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000	236	1	1
NH ₄ H ₂ PO ₄	1000	115,2	0,5	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1000	246,4	0,25	250
KCl	50	3,72		50
MnSO ₄ ·H ₂ O	2	0,338		2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	0,574	1	2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5	0,124		0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,5	0,08		0,5
H ₃ BO ₃	25	1,55	0,5	12,5
Na ₂ EDTA	20	7,44	1	20
FeSO ₄ ·7H ₂ O	20	5,56		20

3.6.1.2 Rastlinný materiál II.

Rastlinný materiál II. bol pestovaný pre stanovenie Hsp70 optimalizovanou metódou ELISA (viď. kap. 4.2.1; 4.4.1; 4.4.3 a 4.5). Semená hrachu Arkta, Arvika a Trendy boli pri izbovej teplote 25 °C ponechané v kadičkách s vodou nabobtnať počas jedného dňa. Nasledujúci deň boli premiestnené do Petriho misiek, na vodou navlhčené servítky, kde sa nechali klíčiť po dobu 3 dní pri izbovej teplote 25 °C. Naklíčené semená boli následne presunuté z Petriho misiek do fytotronu, kde boli pestované hydroponicky za rovnakých podmienok ako pri pestovaní pre SDS-PAGE.

Po siedmich dňoch bol rastlinný materiál vystavený stresovým podmienkam. Rastliny troch genotypov boli rozdelené na tri časti, kedy jedna časť slúžila ako kontrola (izbová teplota 25 °C, tma), druhá časť bola stresovaná teplom v termostate (42 °C, tma) a tretia časť bola stresovaná chladom (4 °C, tma). Všetky rastliny boli pri daných podmienkach ponechané dve hodiny. Potom boli nadzemné časti a korene zozbierané zvlášť v časovom rozmedzí 0; 0,5; 1; 2; 4 a 24 hod. po vystavení stresovým podmienkam.

3.6.1.3 Rastlinný materiál III.

Z dôvodu, že komerčný štandard rastlinných Hsp70 nebolo možné zakúpiť, bol pestovaný genotyp hrachu Trendy, ktorý slúžil ako interný kalibrátor pre ELISA metódu (kap. 4.2.2; 4.2.3; 4.2.4; 4.2.5; 4.2.6; 4.3; 4.4 a 4.5). Semená hrachu Trendy boli ponechané v kadičkách nabobtnať počas jedného dňa pri izbovej teplote 25 °C. Na ďalší deň boli semená premiestnené na vodou navlhčený perlit. Pestovanie trvalo 16 dní a následne bola zozbieraná len nadzemná časť rastlín. Nakoniec bol rastlinný materiál zamrazený pre ďalšie použitie.

3.6.2 Príprava rastlinných extraktov použitých pri SDS-PAGE

Nadzemné časti a korene boli homogenizované na ľade v trecej miske pomocou tľčika. Po homogenizácii bol k rastlinnému materiálu pridaný roztok „R“ v pomere 1:2 (w:v). Následne boli vzorky centrifugované pri teplote 4 °C, počas 10 minút pri maximálnych otáčkach 16 000 x g. Zo zcentrifugovaných vzoriek boli odpipetované supernatanty do nových mikroskúmaviek, ktoré sa nechali inkubovať po dobu 5 minút pri teplote 100 °C. Vzorky sa po inkubácii nechali schladiť a potom boli použité na SDS-PAGE.

3.6.3 SDS-PAGE

Prítomnosť Hsp70 v hrachu siatom genotypoch Arvika a Trendy v stresovaných a kontrolných vzorkách bola určená pomocou metódy SDS-PAGE, pri ktorej bol využitý 4% zaostrovací a 7% deliaci gél. Gély boli pripravené podľa tabuľky 2. Pre zaostrovací gél bol použitý $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl pufor o pH 6,8 a pre deliaci gél $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris/HCl pufor o pH 8,8. Pred zahájením polymerácie bol pridaný TEMED a pre jej vlastné zahájenie 10% (w:v) APS. Elektroforéza prebiehala za konštantného napätia 120 V po dobu približne 15 minút a následne bolo napätie zvýšené na 200 V. Po skončení elektroforézy nasledovalo blotovanie, teda prenos proteínov z gélu na membránu, metódou semi-dry Western blotting.

Tab. 2: Zloženie 4% zaostrovacieho gélu a 7% deliaceho gélu.

Gél (% T)	Deionizovaná voda (ml)	AA/Bis 30% (w:v) (ml)	Pufor (ml)	10% (w:v) SDS (ml)	TEMED (ml)	APS 10% (w:v) (ml)
4	6,1	1,3	2,5	0,1	0,01	0,1
7	5,1	2,3	2,5	0,1	0,01	0,05

3.6.4 Semi-dry Western blotting

Pomocou metódy semi-dry Western blotting boli rozdelené proteíny z gélu prenesené na nitrocelulóзовú membránu s veľkosťou pórov 0,45 μm . Prenos prebiehal 1 hodinu. Po prenose bola nitrocelulóзовá membrána vložená do blokovacieho pufru. Nitrocelulóзовá membrána bola ponechaná v blokovacom pufri na trepačke do druhého dňa a následne bola použitá na imunochemickú detekciu.

3.6.5 Imunochemická detekcia proteínov na membráne

Po prenose proteínov z gélu na nitrocelulóзовú membránu bola prevedená imunochemická detekcia. Membrána, po inkubácii v blokovacom pufri, bola inkubovaná s primárnou protilátkou, ktorou bola monoklonálna protilátka Anti-Heat Shock Protein 70, produkovaná v myši. Protilátka bola riedená v pomere 1:1400 a inkubácia prebiehala dve hodiny. Po uplynutí daného času bola membrána dvakrát po dobu desať minút premytá roztokom Tweenu 20 v TBS. Následne bola na membránu nanesená sekundárna protilátka anti-myšia IgG (Fc špecifická) značená alkalickou fosfatázou produkovaná v koze, ktorá bola riedená v pomere 1:3000. Inkubácia prebiehala dve hodiny. Po inkubácii bola membrána rovnako dvakrát po desať minút premytá roztokom Tweenu 20 v TBS. Nakoniec bola prevedená detekcia farbiacim roztokom. Farbenie membrány prebiehalo cca 5 minút a následne bola premytá destilovanou vodou.

Imunochemická detekcia bola prevedená v niekoľkých opakovaníach, avšak počas experimentov došlo k zmene primárnej aj sekundárnej protilátky. Okrem uvedenej primárnej monoklonálnej protilátky bola na detekciu vyskúšaná primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70, produkovaná v zajacovi a riedená v pomere 1:10000. Použitou sekundárnou protilátkou bola anti-zajačia IgG (celá molekula) značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:5000.

3.6.6 Príprava rastlinných extraktov použitých pri ELISA metóde

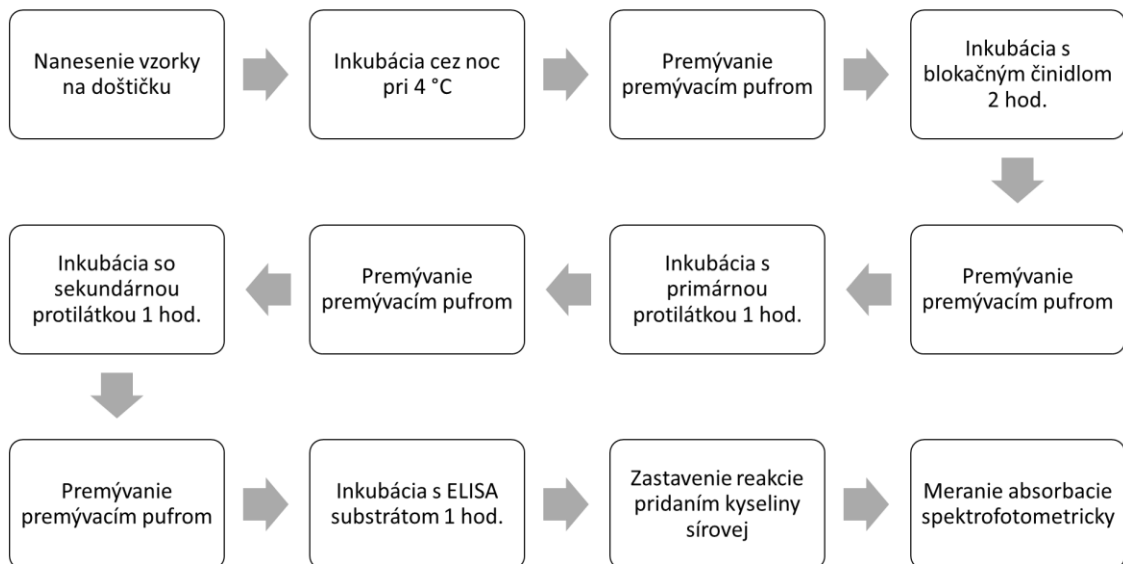
Korene a nadzemné časti boli homogenizované pomocou tláčka v trecej miske. Rastlinný materiál bol homogenizovaný s 10-násobkom väzbového (z angl. coating) pufru. Keďže pri metóde ELISA išlo o optimalizáciu, boli použité štyri rôzne pufry: uhličitanové pufry o pH 7,5; 9,6 a 10,5, ktorých koncentrácia bola 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a K-fosfátový pufr o pH 7 a koncentracii 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následne boli vzorky centrifugované pri teplote 4 $^{\circ}\text{C}$, počas

10 minút pri maximálnych otáčkach 16 000 x g. Po centrifugácii boli supernatanty prepipetované do nových mikroskúmaviek a použité na ELISA metódu.

3.6.7 ELISA

K detekcii a stanoveniu koncentrácie Hsp70 vo vzorkách genotypov hrachu Arkta, Arvika a Trendy slúžila imunologická metóda ELISA. Pre optimalizáciu správnej doštičky boli použité dva typy: 96-jamková ELISA doštička Corning Costar – Sigma-Aldrich, USA a ImmunoPlate F96 Nunc, Maxisorp – Thermo Fisher Scientific, USA. 96-jamková ELISA doštička Corning Costar je schopná viazať stredne veľké a veľké molekuly. Jej väzobná kapacita je približne 400-500 ng IgG·cm⁻². ImmunoPlate F96 Nunc, Maxisorp má kapacitu viazania bielkovín približne 600-650 ng IgG·cm⁻².

Postup ELISA metódy spočíval v niekoľkých krokoch zhrnutých v schéme na obrázku 14. Prvým krokom bolo nanosenie 100 µl vzorky na ELISA doštičku. Doštička s nanesenými vzorkami bola následne inkubovaná cez noc pri teplote 4 °C. Na ďalší deň boli vzorky z jamiek vytrepané, vysušené poklepaním o servítku a premyté prídavkom 200 µl premývacieho pufri. Nasledovala inkubácia s blokačným činidlom (200 µl), ktorá trvala 2 hodiny. Optimalizáciou bolo zvolené vhodné blokačné činidlo spomedzi štyroch rôznych: 0,5% (w:v) roztok sušeného mlieka v premývacom pufri, 0,5% (w:v) roztok sušeného mlieka v premývacom pufri s prídavkom 0,02% (v:v) Tweenu 20, 2% (w:v) roztok BSA v premývacom pufri, 2% (w:v) roztok BSA v premývacom pufri s prídavkom 0,02% (v:v) Tweenu 20. Po inkubácii boli jamky doštičky premyté premývacím pufrom (200 µl). Nasledovala inkubácia s primárnou protilátkou (100 µl) počas jednej hodiny. Použitá bola primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70, produkovaná v zajacovi, ktorej vhodné riedenie bolo optimalizované. Po inkubácii nasledovalo premytie premývacím pufrom (200 µl). Ďalej bola do jamiek pipetovaná sekundárna protilátka (100 µl) a doštička bola inkubovaná po dobu jednej hodiny. Použitá sekundárna protilátka bola anti-zajačia IgG (celá molekula) – značená peroxidázou, produkovaná v koze a riedená v pomere 1:3000. Po inkubácii nasledovalo opäť premytie premývacím pufrom (200 µl). Nasledovala inkubácia s ELISA substrátom (100 µl), po ktorej bola reakcia zastavená prídavkom 50 µl 0,5 mol·l⁻¹ kyseliny sírovej. Nakoniec bola koncentrácia proteínov stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 450 nm. Celý a podrobný postup ELISA metódy s názvom „Stanovenie množstva Hsp70 v semenáčikoch hrachu pomocou ELISA metódy“ je priložený v prílohe 2.



Obr. 14: Schéma krokov postupu metódy ELISA.

4 VÝSLEDKY

Zameraním experimentálnej časti diplomovej práce bolo zavedenie metódy ELISA pre stanovenie Hsp70, ktoré boli na Katedre biochémie doteraz detegované len pomocou Western blotu. Po optimalizácii bola metóda ELISA použitá pre stanovenie Hsp70 v rastlinnom materiáli hrachu siateho u genotypov Arkta, Arvika, a Trendy v kontrolných a teplom a chladom stresovaných vzorkách. V rámci metódy Western blot bola používaná sekundárna protilátka značená alkalickou fosfatázou, zatiaľ čo pri metóde ELISA sekundárna protilátka značená peroxidázou.

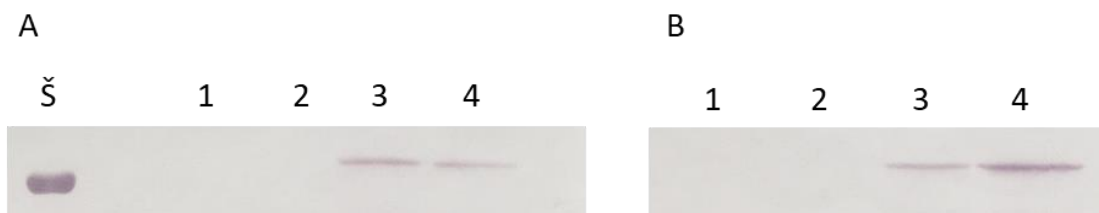
4.1 Testovanie primárnych protilátok pre stanovenie množstva Hsp70 pomocou metódy Western blot

4.1.1 Použitie monoklonálnej protilátky (Merck)

V prvom realizovanom experimente boli Hsp70 stanovené metódou Western blot s využitím protilátok používaných na Katedre biochémie pomocou už zavedeného protokolu. V protokole sa pracuje s primárnou monoklonálnou protilátkou Anti-Heat Shock Protein 70, ktorá je produkovaná v myši a riedená 1:1400. Použitá sekundárna protilátka je Anti-myšia IgG (Fc špecifická) produkovaná v koze, značená alkalickou fosfatázou a riedená 1:3000. Pre kvantifikáciu bol používaný štandard Hsp70 z hovädzieho mozgu.

V experimente bolo skúšané, či dôjde k naviazaniu monoklonálnej protilátky na rastlinné Hsp70, pretože na stránkach Merck je uvedené, že aj táto protilátka je vhodná pre rastlinné vzorky. Následne bola zakúpená a testovaná iná, špecifická, rastlinná primárna protilátka zo spoločnosti Agrisera (vid'. kap. 4.1.2).

Obrázok 15 (A, B) zobrazuje detegované Hsp70 v rastlinných vzorkách (nadzemná časť) hrachu siateho genotypu Arvika a Trendy detegované metódou Western blot s využitím nitrocelulózovej membrány po imunochemickej detekcii a farbení roztokmi NBT a BCIP (detekcia alkalickej fosfatázy). Rastliny boli vystavené tepelnému stresu (inkubácia 2 h pri teplote 42 °C v tme). Z výsledkov je zrejmé, že Hsp70 boli detegované len v nadzemnej časti, zatiaľ čo v koreňoch vôbec. Vplyv tepelného stresu na zvýšenie produkcie Hsp70 bol zaznamenaný len u hrachu siateho v genotype Trendy.



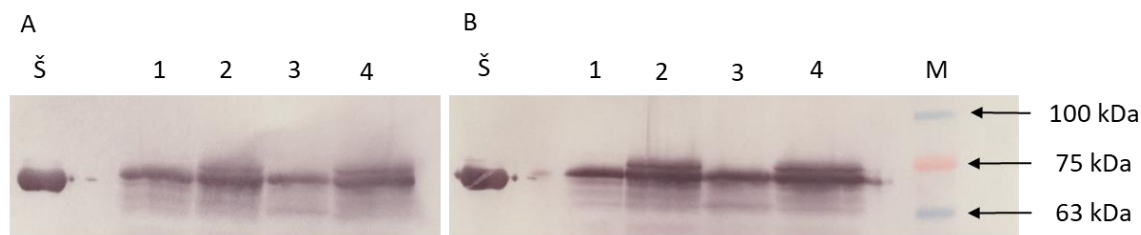
Obr. 15: Hsp70 detegované u hrachu siateho genotypu Arvika (A) a Trendy (B) metódou Western blot s použitím monoklonálnej protilátky proti Hsp70. Š – štandard (0,05 μ g); 1 – koreň (kontrola); 2 – koreň (tepelný stres); 3 – nadzemná časť (kontrola); 4 – nadzemná časť (tepelný stres). Primárna protilátka: monoklonálna Anti-Heat Shock Protein 70 (Sigma-Aldrich), produkovaná v myši a riedená 1:1400. Sekundárna protilátka: Anti-myšia IgG (Fc špecifická) značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:3000.

4.1.2 Použitie polyklonálnej protilátky (Agrisera)

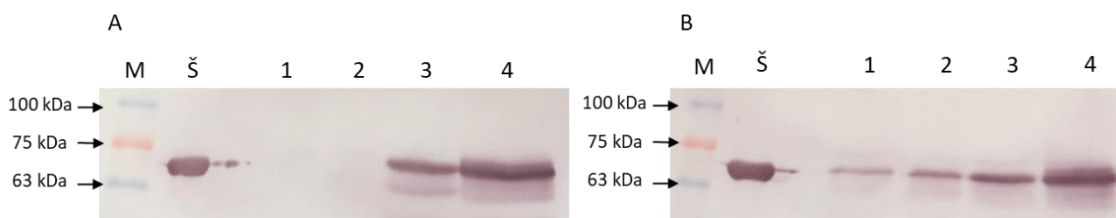
Pre porovnanie výsledkov detekcie Hsp70 metódou Western blot s využitím primárnej monoklonálnej protilátky (viď. kap. 4.1.1) bola zakúpená polyklonálna protilátka od firmy Agrisera, ktorá podľa produktového listu (z angl. datasheet), je určená predovšetkým pre stanovenie Hsp70 v rastlinných vzorkách a je u nej predikovaná reaktivita aj priamo pre testovaný hrach *Pisum sativum*. Výrobca doporučuje riedenie protilátky 1:3000 – 1:10000. Pre optimalizáciu vhodného riedenia protilátky bolo testované riedenie 1:5000 (obr. 16 B), 1:7500 (obr. 16 A) a 1:10000 (obr. 17 A, B). Použitá bola sekundárna protilátka anti-zajačia IgG (celá molekula), produkovaná v koze, značená alkalickou fosfatázou a riedená 1:5000.

Porovnaním signálov na membráne pri použití riedenia primárnej polyklonálnej protilátky proti Hsp70 1:5000, 1:7500 a 1:10000 sa javí ako najoptimálnejšie riedenie 1:10000 (obr. 16 a 17). Výsledky tiež ukazujú, že v rastlinách vystavených tepelnému stresu je množstvo Hsp70 vyššie v porovnaní s kontrolnými vzorkami u oboch testovaných genotypov Arvika a Trendy. V nadzemnej časti teplom stresovaných rastlín je možné pozorovať prítomnosť novo produkovaného Hsp70 o vyššej molekulovej hmotnosti (obr. 16, 17). Z výsledkov na obrázku 17 A, je viditeľné, že Hsp70 sa u genotypu Arvika nachádzajú len v kontrolnej a stresovanej vzorke nadzemnej časti, zatiaľ čo vo vzorkách koreňa nie. V prípade genotypu Trendy (obr. 17 B) boli Hsp70 detegované v kontrolných a stresovaných vzorkách koreňa a rovnako tak aj v kontrolných a stresovaných vzorkách nadzemnej časti. Pomocou primárnej polyklonálnej protilátky proti Hsp70 (obr. 17) na rozdiel od použitia monoklonálnej protilátky proti Hsp70

(obr. 15) boli detegované Hsp70 aj v koreňoch hrachu siateho genotyp Trendy a v prípade teplom stresovaných rastlín bola ich produkcia vyššia.



Obr. 16: Hsp70 detegované u hrachu siateho genotypu Arvika a Trendy metódou Western blot s použitím polyklonálnej protilátky proti Hsp70. Primárna protilátka: polyklonálna Heat Shock Protein 70 (Agrisera), produkovaná v zajacovi a riedená 1:7500 (A), 1:5000 (B). Sekundárna protilátka: Anti-zajačia IgG (celá molekula), značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:5000. Š – štandard (0,05 μ g); 1 - nadzemná časť genotyp Trendy (kontrola); 2 – nadzemná časť genotyp Trendy (teplný stres); 3 – nadzemná časť genotyp Arvika (kontrola); 4 – nadzemná časť genotyp Arvika (teplný stres); M – marker molekulovej hmotnosti.

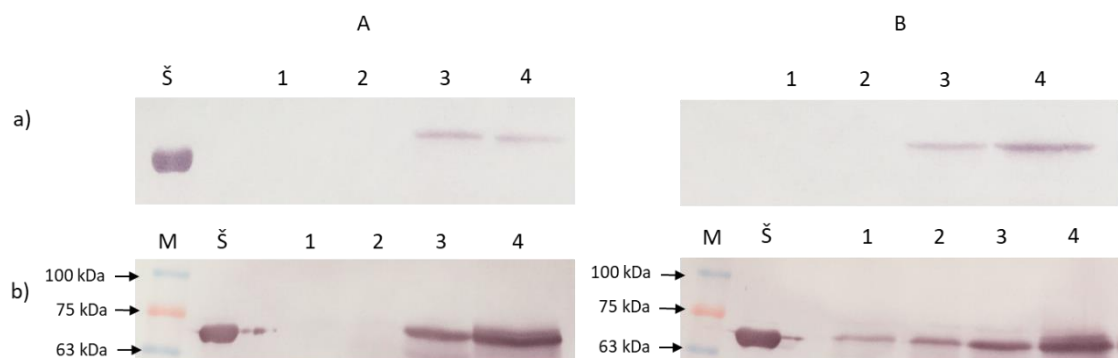


Obr. 17: Hsp70 detegované u hrachu siateho genotypu Arvika (A) a Trendy (B) metódou Western blot s použitím polyklonálnej protilátky proti Hsp70. Primárna protilátka: polyklonálna Heat Shock Protein 70 (Agrisera), produkovaná v zajacovi a riedená 1:10000. Sekundárna protilátka: Anti-zajačia IgG (celá molekula) značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:5000. Š – štandard (0,05 μ g); 1 - koreň (kontrola); 2 – koreň (teplný stres); 3 – nadzemná časť (kontrola); 4 – nadzemná časť (teplný stres); M – marker molekulovej hmotnosti.

4.1.3 Porovnanie monoklonálnej a polyklonálnej protilátky

Rastlinné vzorky genotypu Arvika a Trendy vystavené tepelnému stresu spolu s kontrolnými vzorkami po imunochemickej detekcii a farbení roztokmi NBT a BCIP sú zobrazené na obrázku 18 (A, B). Boli použité dve rôzne primárne protilátky: a) monoklonálna protilátka Anti-Heat Shock Protein 70, protilátka produkovaná v myši, riedená 1:1400 a b) primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70 riedená 1:10000. Sekundárna protilátka použitá spoločne s primárnou monoklonálnou protilátkou bola anti-myšia IgG (Fc špecifická) značená alkalickou fosfatázou produkovaná v koze a riedená v pomere 1:3000. Sekundárna protilátka, ktorá bola použitá v experimentoch s primárnou polyklonálnou protilátkou bola anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze, značená alkalickou fosfatázou a riedená 1:5000. Použitý bol živočíšny štandard Hsp70 z hovädzieho mozgu.

Z výsledkov je vidieť, že v prípade genotypu Arvika, vyšiel rovnaký výsledok pri použití monoklonálnej aj polyklonálnej protilátky a Hsp70 boli detegované len v nadzemnej časti. Čo sa týka genotypu Trendy, pri použití monoklonálnej protilátky boli Hsp70 detegované len v nadzemnej časti, zatiaľ čo v prípade použitia polyklonálnej protilátky aj vo vzorkách koreňa. Podľa markeru je možné približne stanoviť molekulovú hmotnosť na 70 kDa, čo zodpovedá požadovaným Hsp.



Obr. 18: Hsp70 detegované u hrachu siateho genotypu Arvika (A) a Trendy (B) metódou Western blot s použitím primárnej monoklonálnej a polyklonálnej protilátky. Primárna protilátka: a) monoklonálna Anti-Heat Shock Protein 70 (Sigma-Aldrich), produkovaná v myši, riedená 1:1400 a b) polyklonálna Heat Shock Protein 70 (Agrisera), produkovaná v zajacovi a riedená 1:10000. Sekundárna protilátka použitá s primárnou monoklonálnou protilátkou: Anti-myšia IgG (Fc špecifická) značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:3000. Sekundárna protilátka použitá s primárnou polyklonálnou protilátkou: Anti-zajačia IgG (celá molekula), značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:5000. Š – štandard (0,05 μ g), 1 – koreň (kontrola); 2 - koreň (tepelný stres); 3 – nadzemná časť (kontrola); 4 – nadzemná časť (tepelný stres).

4.2 Optimalizácia metódy ELISA

Optimalizácia metódy ELISA pozostávala z viacerých krokov, ktoré zahŕňali výber vhodnej ELISA doštičky, väzbového (coating) pufru, blokačného činidla, riedenia vzorky a riedenia primárnej polyklonálnej protilátky proti Hsp70. Po optimalizovaní krokov bola metóda ELISA využitá k stanoveniu množstva Hsp70 u genotypov Arkta, Arvika a Trendy (kap. 4.5). Experimenty týkajúce sa optimalizácie jednotlivých krokov boli robené v minimálne dvoch opakovaníach. Pre metódu ELISA bola používaná primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70 a sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou.

4.2.1 Výber vhodnej ELISA doštičky

Pri výbere vhodnej ELISA doštičky boli použité dva typy, a to 96-jamková ELISA doštička Corning Costar a ImmunoPlate F96 Nunc, Maxisorp. Na obe doštičky boli pipetované blanky (uhličitanový pufr o pH 9,6 bez prídavku vzorky) a štandardy o koncentrácii 2, 10 a 100 ng·ml⁻¹. Ako štandard bol použitý štandard Hsp70 z hovädzieho mozgu. Proteíny z rastlinného materiálu boli extrahované v uhličitanovom pufri o pH 9,6. Použité vzorky sú uvedené v tabuľke 3. Metóda ELISA bola realizovaná podľa postupu s názvom „Stanovenie množstva Hsp70 v semenáčikoch hrachu pomocou ELISA metódy“, ktorý je priložený v prílohe 2. Z výsledkov porovnania doštičky Corning Costar a ImmunoPlate F96 Nunc je možné pozorovať, že doštička Corning Costar mala lepšie väzobné schopnosti a detegovaný signál bol vyšší. V pripravených extraktoch z nadzemnej časti oboch genotypov aplikovaných na doštičku Corning Costar bol signál príliš vysoký. Na základe uvedených výsledkov bola pre ďalšie merania zvolená 96-jamková ELISA doštička Corning Costar.

Štandard aplikovaný v použitej koncentrácii nevykazoval signál na doštičke ImmunoPlate F96 Nunc. V prípade použitia doštičky Corning Costar bol signál štandardu detegovaný. Signál detegovaný v prípade tepelne stresovanej vzorky je vyšší ako v kontrolnej vzorke pri realizácii stanovenia na oboch typoch testovaných doštičiek, čo koreluje s výsledkami získanými metódou Western blot (kap. 4.1). Efekt tepelného stresu na zvýšenie produkcie Hsp70 nie je možné jednoznačne potvrdiť na základe tohto orientačného experimentu, pretože neboli získané korešpondujúce výsledky pri použití testovaných doštičiek. Pre jednoznačné vyhodnotenie vplyvu tepelného stresu

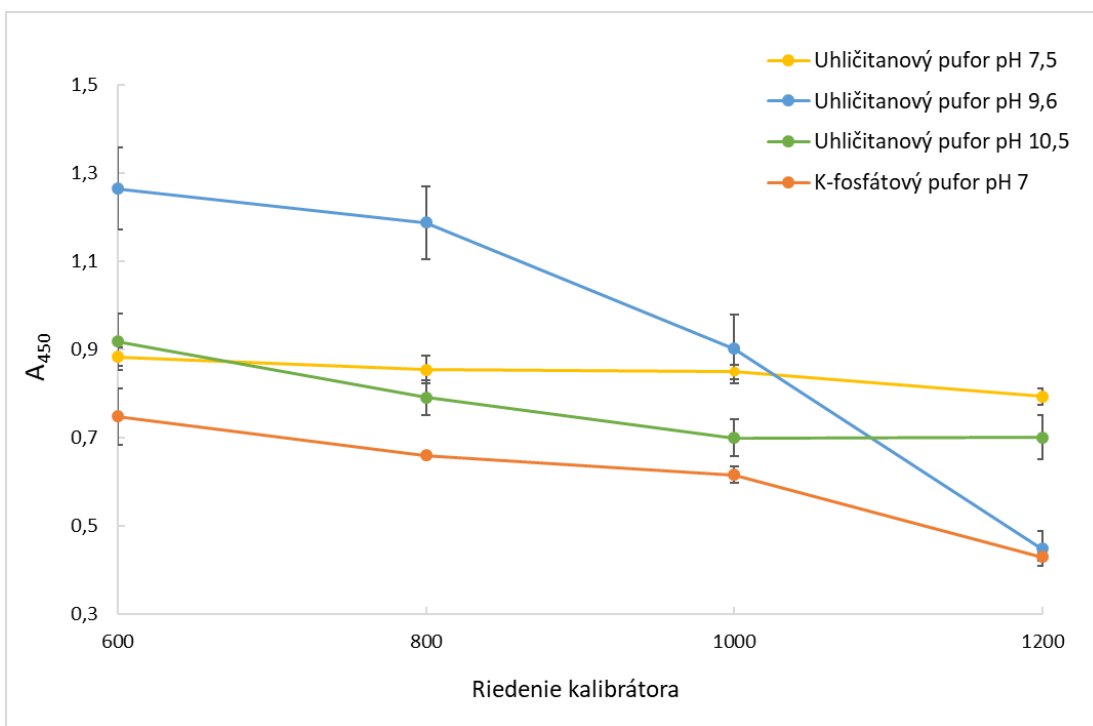
na produkciu Hsp70 boli následne realizované ciele experimenty s využitím optimalizovanej metódy ELISA.

Tab. 3: Absorbancia nameraná pri 450 nm pre stanovenie Hsp70 v rámci pozorovania dvoch testovaných ELISA doštičiek. K – kontrola, TS – tepelný stres, *Nd – nedetegované, príliš vysoká hodnota.

Aplikácia vzoriek na doštičky			Doštička Corning Costar			Doštička ImmunoPlate F96 Nunc		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
Blank	Arvika koreň (K)	Trendy koreň (K)	0,152	2,965	3,699	0,146	1,127	2,924
Štandard 2 ng·ml ⁻¹	Arvika koreň (TS)	Trendy koreň (TS)	0,16	2,901	3,828	0,151	2,519	3,452
Štandard 10 ng·ml ⁻¹	Arvika nadzemná časť (K)	Trendy nadzemná časť (K)	0,168	*Nd	*Nd	0,147	3,885	4,04
Štandard 100 ng·ml ⁻¹	Arvika nadzemná časť (TS)	Trendy nadzemná časť (TS)	0,195	*Nd	*Nd	0,131	3,921	4,01

4.2.2 Výber vhodného väzbového pufru

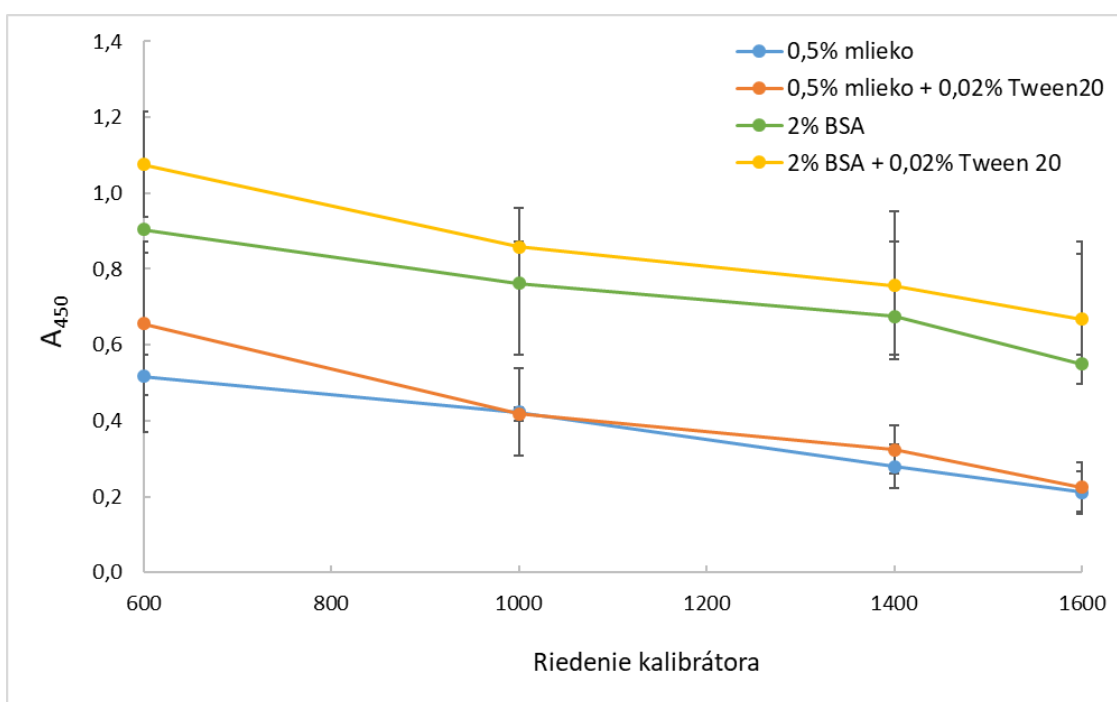
Pre testovanie vhodného väzbového pufru pre metódu ELISA boli použité uhličitanové pufrы s hodnotou pH: 7,5; 9,6 a 10,5 a K-fosfátový pufr s pH 7. Použitým blokačným činidlom bol 0,5% roztok sušeného mlieka, primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70 bola riedená 1:5000 a sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou bola riedená 1:3000. Namiesto štandardu Hsp70, ktorý v rastlinnej forme nie je dostupný, bol pre analýzy použitý kalibrátor, ktorý bol pripravený extrakciou nadzemnej časti genotypu Trendy (vid'. kap. 3.6.1.3) v testovaných pufróch a zriedený 600, 800, 1000 a 1200x. Z výsledkov ELISA metódy bolo zistené, že najvhodnejším pufrom na extrakciu je uhličitanový pufr s pH 9,6 (obr. 19). V prípade použitého uhličitanového pufru pH 9,6 bol pozorovaný najvýraznejší efekt riedenia kalibrátora na detegovaný signál.



Obr. 19: Testovanie vplyvu zloženia väzbového pufru. Závislosť absorbancie pri 450 nm na riedenie kalibrátora (600, 800, 1000 a 1200x) v kombinácii s použitými testovanými väzbovými puframi o pH v rozsahu 7 – 10,5.

4.2.3 Testovanie vhodného blokačného činidla

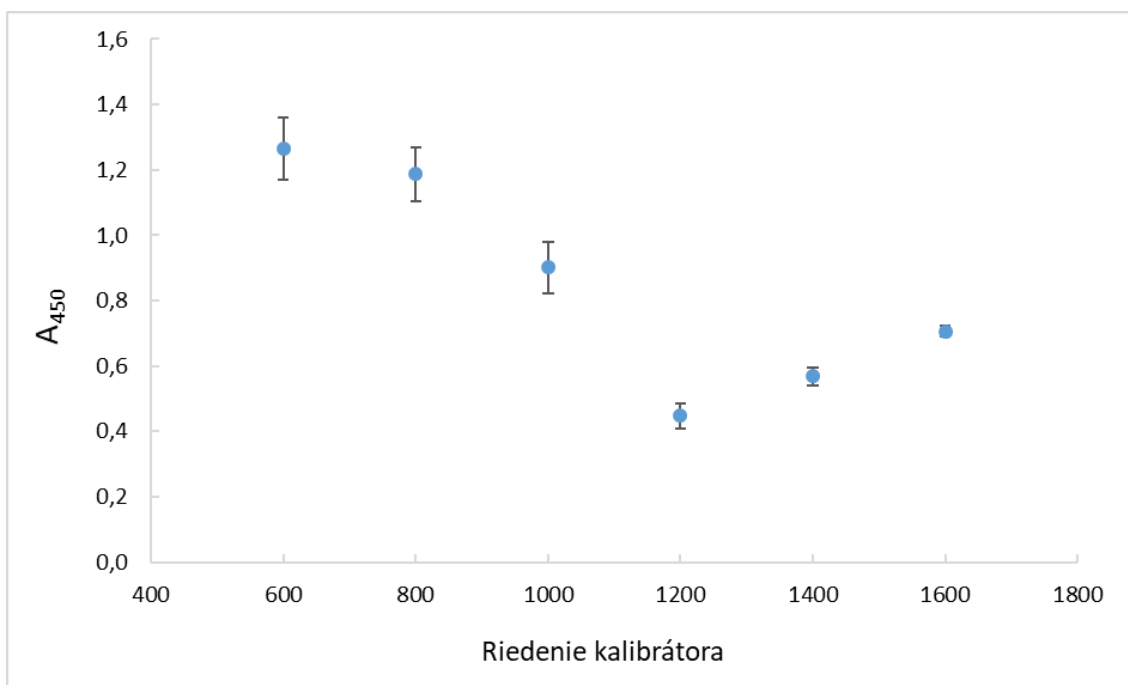
Pre zablokovanie neobsadených miest na povrchu jamiek boli testované dva proteínové blokátory, buď samotné alebo s prídavkom neionogénneho detergentu. Konkrétne to boli tieto varianty: 1) 0,5% roztok sušeného mlieka 2) 0,5% roztok sušeného mlieka s 0,02% Tweenom 20 3) 2% roztok BSA a 4) 2% roztok BSA s 0,02% Tweenom 20. Pre tieto merania bol použitý kalibrátor extrahovaný v uhličitanovom pufrí s pH 9,6 (vychádza z kap. 4.2.2) v rôznych riedeniach (600, 1000, 1400, 1600x). Primárna polyklonálna protilátka bola riedená 1:5000 a sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou 1:3000. Pre ďalšie experimenty bolo zvolené blokačné činidlo 2% roztok BSA s 0,02% Tweenom 20 (obr. 20).



Obr. 20: Testovanie vplyvu zloženia blokovacieho roztoku. Závislosť absorbanie pri 450 nm na riedenie kalibrátora (600, 1000, 1400 a 1600x) v kombinácii s použitými testovanými blokačnými činidlami. BSA – hovädzí sérový albumín.

4.2.4 Optimalizácia vhodného riedenia vzorky

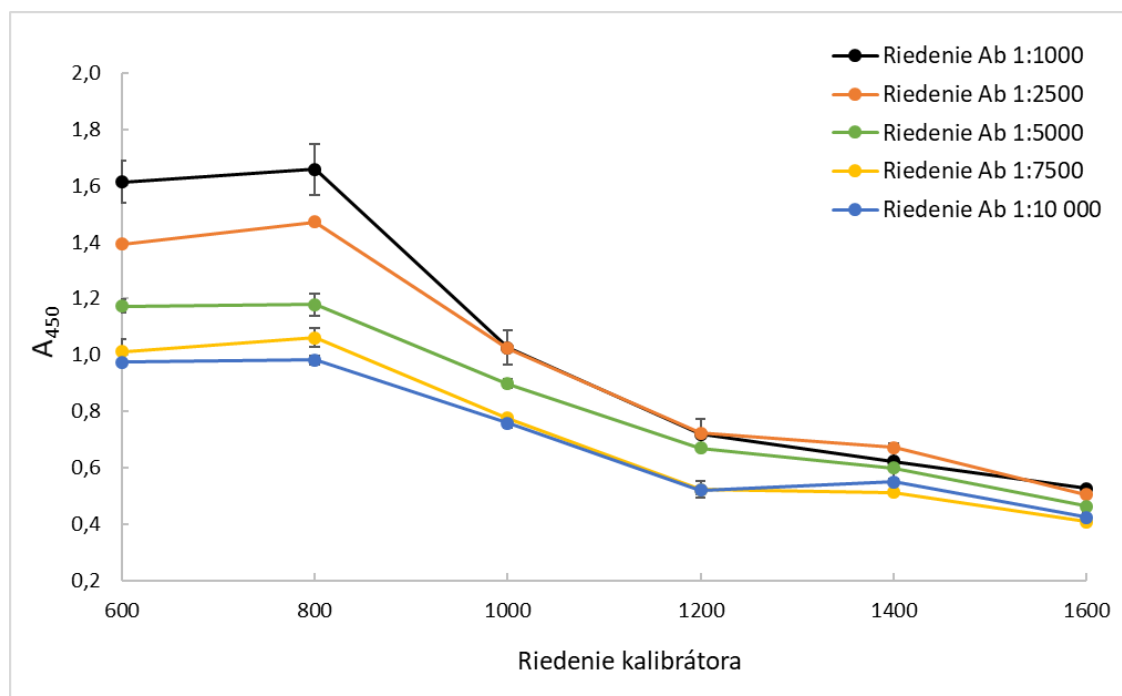
Pri testovaní rôznych riedení vzorky bol použitý pripravený kalibrátor, ktorý bol extrahovaný v uhličitanovom pufri s pH 9,6 a zriedený 600x – 1600x. Použitým blokačným činidlom bol 2% roztok BSA s prídavkom 0,02% Tweenu 20 (vychádza z kap. 4.2.3). Primárna polyklonálna protilátka bola riedená 1:5000 a sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou 1:3000. V grafe na obr. 21 je možné pozorovať klesajúci trend absorbancie v závislosti na znižujúcej sa koncentrácii Hsp70, a to až do riedenia 1200x, potom dochádza k opačnému trendu, kedy absorbancia so znižujúcou sa koncentráciou Hsp70 narastá. Ako optimálne riedenie kalibrátora pre dosiahnutie správnych výsledkov bolo zvolené riedenie 1000x. Pri nižších riedeniach (600x a 800x) bola hodnota absorbancie nameraná pri 450 nm už vyššia ako hodnota 1.



Obr. 21: Optimalizácia vhodného riedenia vzorky pre metódu ELISA. Absorbancie rôzne riedeného kalibrátora (600x – 1600x) pri ELISA metóde.

4.2.5 Stanovenie vhodného riedenia primárnej protilátky

K zisteniu najvhodnejšieho riedenia primárnej polyklonálnej Hsp70 protilátky boli použité riedenia 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500 a 1:10000. Ako vzorka slúžil opäť kalibrátor 600x – 1600x zriedený. Pre ELISA metódu boli použité už optimalizované kroky vid'. kapitoly 4.2.2; 4.2.3 a 4.2.4, tzn. väzbový uhličitanový pufoer pH 9,6 a blokačné činidlo 2% BSA s 0,02% Tweenom 20. Sekundárna protilátka anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou bola riedená 1:3000. Podľa výsledkov znázornených na obrázku 22 je najvhodnejším riedením primárnej protilátky 1:1000. Avšak, vzhľadom na šetrenie protilátky nebolo zvolené, a rovnako tak ani riedenie 1:2500. Riedenia primárnej protilátky 1:7500 a 1:10000 taktiež neboli určené ako vyhovujúce, pretože pri riedení kalibrátora 1000x sa vzájomne ich hodnoty absorbancie prekrývali. Preto bolo ako vhodné riedenie primárnej protilátky pre ďalšie merania zvolené riedenie 1:5000.



Obr. 22: Testovanie vplyvu riedenia primárnej protilátky. Závislosť absorbancie pri 450 nm na riedení kalibrátora (600, 800, 1000, 1200, 1400 a 1600x) v kombinácii s riedením primárnej polyklonálnej protilátky proti Hsp70.

4.2.6 Testovanie možných interferencií počas ELISA metódy

V rámci optimalizácie metódy ELISA boli otestované aj možné interferencie a vznik nešpecifických väzieb medzi blokačným činidlom, protilátkami, prípadne vzorkou kalibrátora, a preto boli premerané rôzne zloženie blankov (tab. 4). ELISA metóda bola realizovaná podľa postupu uvedenom v prílohe s názvom „Stanovenie množstva Hsp70 v semenáčikoch hrachu pomocou ELISA metódy“. Primárna polyklonálna protilátka bola riedená 1:5000 a sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) produkovaná v koze a značená peroxidázou 1:3000.

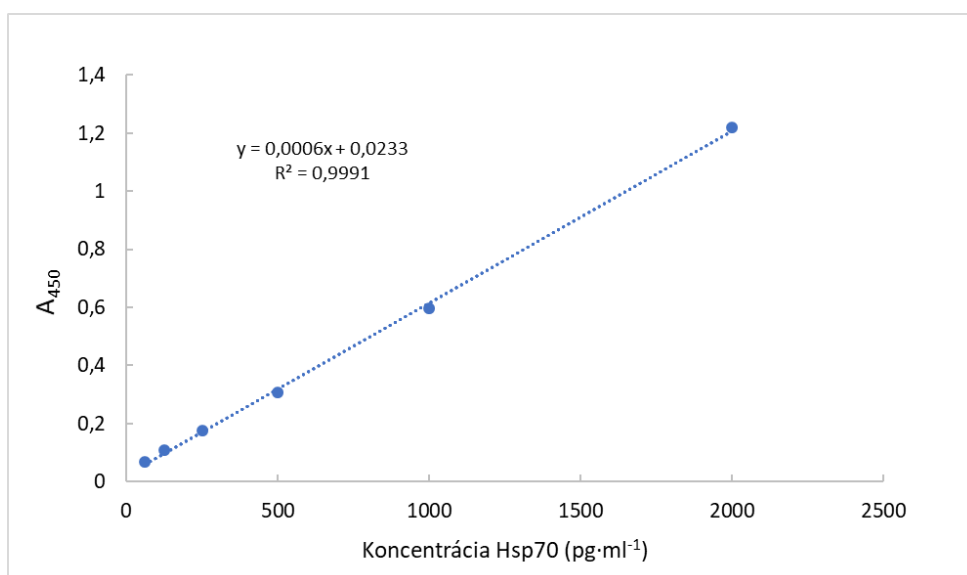
Pri stanovení možných interferencií pri ELISA metóde boli robené vždy tri technické replikáty a stanovená priemerná hodnota absorbancie je uvedená v tabuľke 4. Z výsledkov bolo možné pozorovať, že všetky typy blankov, okrem blanku 3, mali nízku hodnotu absorbancie. Na základe nameraných hodnôt absorbancií bolo zistené, že u blanku 3 dochádzalo k interferencii medzi kalibrátorom, blokačným činidlom a sekundárnou protilátkou. Pre ďalšie merania bol preto použitý blank, ktorý bol špecifický pre každú vzorku. Blank obsahoval konkrétnu vzorku, prídavok blokačného činidla, primárna protilátka bola vynechaná a nahradená väzbovým pufrom, a následne bola pridaná sekundárna protilátka. Takýto typ blanku bol využitý pri meraní všetkých vzoriek rastlinného materiálu popísaných v kapitole 4.4.1 a 4.5.

Tab. 4: Zloženie siedmich typov blankov použitých pri optimalizácii metódy ELISA. Blank 3 obsahoval prídavok kalibrátora s riedením 600, 800, 1000, 1200, 1400 a 1600x. Blank 5 obsahoval prídavok kalibrátora s riedením 600, 1000 a 1400x. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 450 nm. + = bolo pridané do reakcie, - = nebolo pridané do reakcie.

	Blank 1	Blank 2	Blank 3						Blank 4	Blank 5			Blank 6	Blank 7
Riedenie pridaného kalibrátora	-	-	600x	800x	1000x	1200x	1400x	1600x	-	600x	1000x	1400x	-	-
Blokačné činidlo (0,5% mlieko + 0,02% Tween 20)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Blokačné činidlo (2% BSA + 0,02% Tween 20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Primárna protilátka	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sekundárna protilátka	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
A ₄₅₀	0,102	0,134	0,680	0,885	0,354	0,444	0,221	0,262	0,081	0,139	0,155	0,136	0,135	0,124

4.3 Stanovenie koncentrácie Hsp70 v používanom kalibrátore

Pre určenie kvantitatívneho množstva Hsp70 vo vzorkách bolo nutné používať štandard, ktorý však pre rastlinné Hsp70 nie je komerčne dostupný. Preto sme si pripravili vlastný „štandard“ – kalibrátor a podľa zakúpeného kitu chceli určiť presnú koncentráciu Hsp70 v tejto vzorke. Na internete (<https://www.mybiosource.com/plant-elisa-kits/heat-shock-protein-70-hsp70/9370793>) bol nájdený jediný kit, ktorý by mal umožniť kvantitatívne stanoviť koncentráciu Hsp70 v rastlinných vzorkách. Jednalo sa o kit s názvom Plant Heat Shock Protein 70 (Hsp70) ELISA Kit. Cat.No: MBS9370793. Manuál k tomuto kitu je vložený na konci diplomovej práce ako príloha 1. Postup zahŕňal prídavok šiestich štandardov o nasledujúcich koncentráciách: 62,5; 125, 250, 500, 1000 a 2000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ďalej bola ku každému štandardu, pipetovaných do priložených stripov, pridaná reagentia konjugovaná s chrenovou peroxidázou. Vzorky boli inkubované počas jednej hodiny pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po uplynutí času boli štyrikrát premyté priloženým premývacím roztokom riedeným 20x destilovanou vodou. Použitie kitu bolo založené na princípe sendvičovej ELISA metódy, kedy bola využitá imunoenzýmová reakcia bezfarebného substrátu, chromogenu B (TMB), ktorý bol hydrolyzovaný na farebný produkt. K chromogenu B bol pridaný roztok pre zastavenie reakcie s prídavkom kyseliny sírovej. Nakoniec bola absorbanca zmeraná spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 450 nm. Koncentrácie štandardov a ich zmerané absorbancie boli použité na zhotovenie kalibračnej krivky a rovnice priamky (obr. 23), ktorá slúžila k stanoveniu koncentrácie Hsp70 v napestovanom kalibrátore.



Obr. 23: Graf kalibračnej krivky závislosti A_{450} na koncentrácii Hsp70 ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Podľa návodu, ktorý bol priložený pri kите, sa na analýzu mali použiť neriedené rastlinné vzorky a v prípade nameranej absorbančie prekračujúcej hodnotu 1 mohli byť vzorky zriedené 1x alebo 2x. Neriedený kalibrátor bol pipetovaný do jamiek stripu a pre detekciu Hsp70 bol použitý rovnaký postup ako aj v prípade stanovení štandardov (viď. text vyššie). Výsledky stanovenia koncentrácie Hsp70 v napestovanom kalibrátore (tab. 5) boli získané výpočtom z rovnice priamky kalibračnej závislosti. Merania boli opakované v troch technických replikátoch a uvedená je priemerná hodnota. Okrem stanovenia koncentrácie Hsp70 v kalibrátore, bol kit použitý aj na stanovenie koncentrácie Hsp70 v jednotlivých vzorkách a výsledky sú podrobnejšie analyzované v kapitole 4.4.3.

Tab. 5: Stanovenie koncentrácie Hsp70 s využitím komerčne dostupného kitu vo vzorke pripraveného kalibrátora.

	Neriedená vzorka kalibrátora
A_{450}	0,537
Koncentrácia ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	856,17

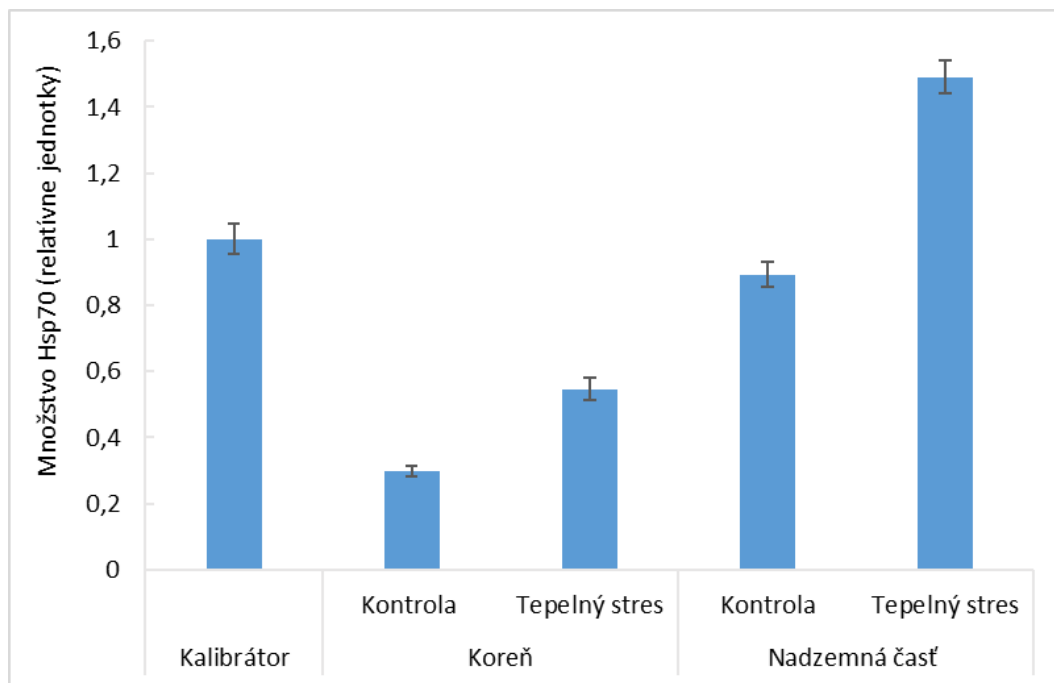
4.4 Porovnanie stanovenia množstva Hsp70 tromi metódami

K stanoveniu množstva Hsp70 v rastlinnom materiáli boli použité tri metódy, a to 1) ELISA – optimalizovaný postup 2) Western blot a 3) ELISA – komerčný kit. Získané výsledky boli vzájomne porovnané. Pre všetky metódy boli použité tieto rastlinné vzorky: pripravený kalibrátor, kontrolné a teplom stresované korene a nadzemné časti genotypu Trendy zozbierané hneď po vystavení 2h tepelnému stresu pri teplote 42 °C. Pre Western blot aj metódu ELISA bola použitá primárna polyklonálna protilátka riedená v pomere 1:5000 pre metódu ELISA a 1:10000 pre Western blot. Sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) značená peroxidázou a produkovaná v koze bola riedená 1:3000 pre metódu ELISA a pre Western blot bola použitá sekundárna protilátka anti-zajačia značená alkalickou fosfatázou riedená v pomere 1:5000. Použité rastinné vzorky boli riedené 1000x pre metódu ELISA a pre Western blot a metódu ELISA – komerčný kit sa použili neriedené vzorky.

4.4.1 Stanovenie množstva Hsp70 metódou ELISA (optimalizovaný postup)

Metóda ELISA prebiehala podľa optimalizovaných krokov (príloha 2), čiže bola použitá doštička Corning Costar, rastlinný materiál bol extrahovaný v uhličitanovom pufri o pH 9,6 a následne 1000x nariedený. Ako blokačné činidlo bol použitý 2% roztok BSA v premývacom pufri s prídavkom 0,02% Tweenu 20 a primárna polyklonálna protilátka proti Hsp70 pripravená v zajacovi bola riedená v pomere 1:5000 v premývacom pufri. Sekundárna anti-zajačia IgG (celá molekula) pripravená v koze a značená peroxidázou bola riedená v premývacom pufri v pomere 1:3000. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 450 nm.

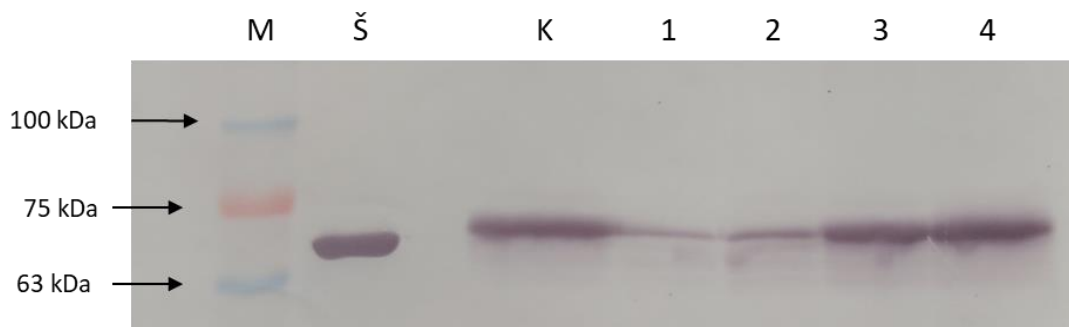
Množstvo Hsp70 bolo prepočítané na relatívne jednotky, kedy hodnota jedna bola vždy priradená kalibrátoru (obr. 24). Vzorky kontrolného aj teplom stresovaného koreňa genotypu Trendy vykazovali voči vzorkám nadzemnej časti menšie množstvo Hsp70. Po vystavení stresu bolo množstvo Hsp70, či už v koreni alebo nadzemnej časti, zvýšené v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Najviac Hsp70 sa podľa výsledkov nachádza v nadzemnej časti stresovanej teplom, a naopak najmenej vo vzorkách koreňa.



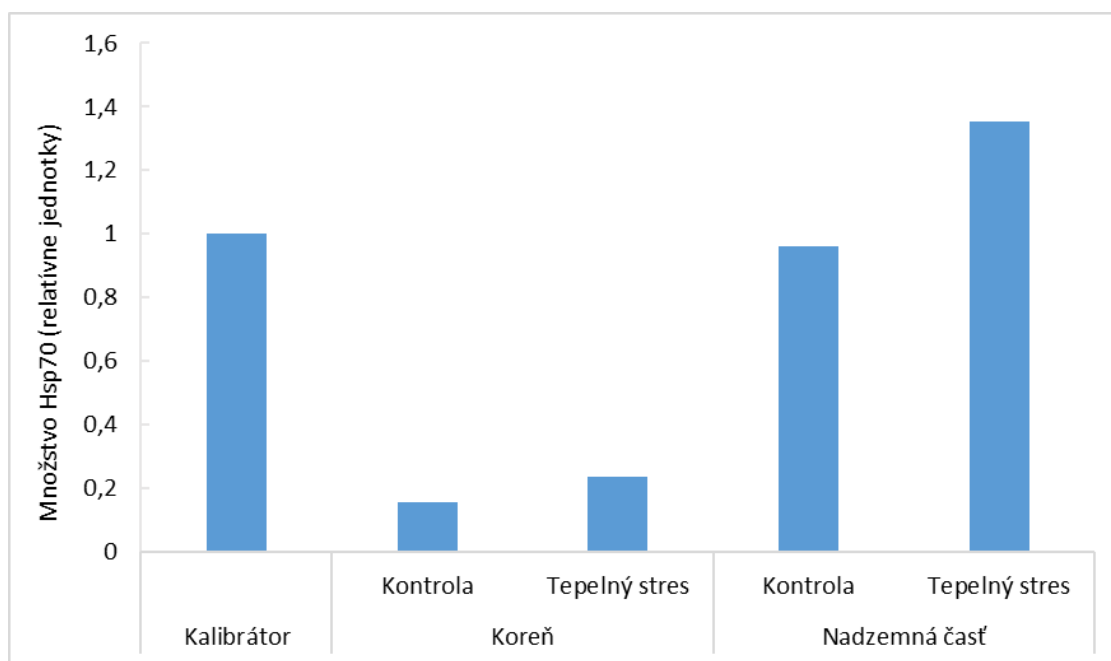
Obr. 24: Stanovenie množstva Hsp70 optimalizovanou metódou ELISA. Použitým rastlinným materiálom boli kontrolné a teplom stresované korene a nadzemné časti genotypu Trendy zozbierané hneď po vystavení stresu.

4.4.2 Stanovenia množstva Hsp70 metódou Western blot

Ďalšou metódou použitou pre stanovenie množstva Hsp70 v rastlinnom materiáli bol Western blot s následnou imunodetekciou (obr. 25). Použitá bola primárna polyklonálna protilátka Hsp70 riedená v pomere 1:10000 a sekundárna protilátka anti-zajačia značená alkalickou fosfatázou riedená v pomere 1:5000. Pre porovnanie s výsledkami stanovení Hsp70 optimalizovanou metódou ELISA bolo realizované denzitometrické vyhodnotenie pomocou programu ImageJ (obr. 26). Porovnaním obrázkov 24 a 26 je jasné, že množstvo Hsp70 v rastlinných vzorkách stanovené pomocou metódy ELISA aj Western blot, je zrovnateľné.



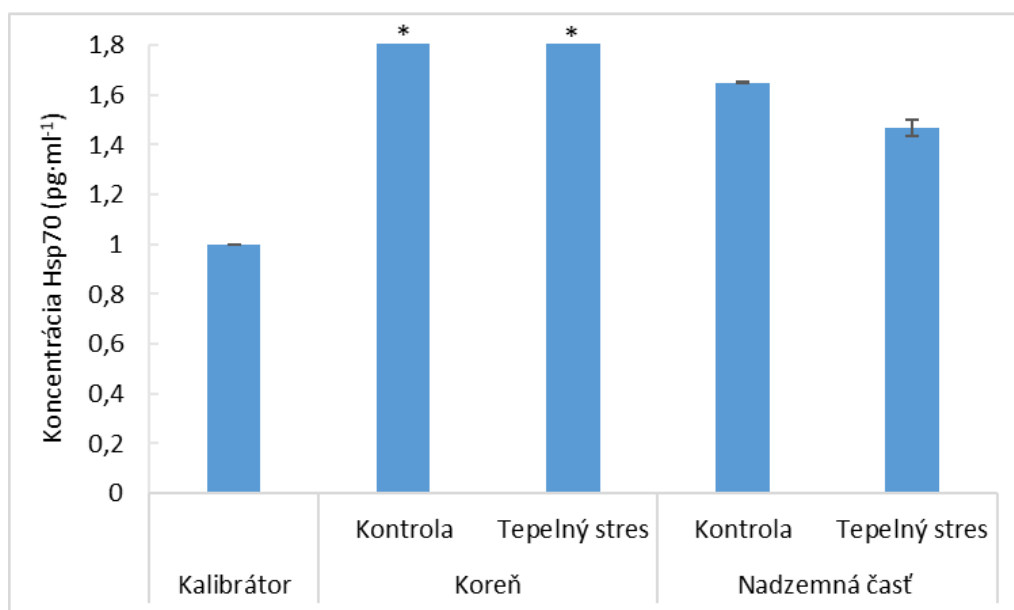
Obr. 25: Hsp70 detegované v kontrolných a teplom stresovaných koreňoch a nadzemných častiach genotypu Trendy zozbierané hneď po vystavení stresu. Primárna protilátka: polyklonálna Heat Shock Protein 70 (Agrisera), produkovaná v zajacovi a riedená 1:10000. Sekundárna protilátka: Anti-zajačia IgG (celá molekula) značená alkalickou fosfatázou, produkovaná v koze a riedená 1:5000. M - marker, Š – štandard (0,05 µg); K - napestovaný kalibrátor; 1 – koreň (kontrola); 2 – koreň (teplný stres); 3 - nadzemná časť (kontrola); 4 – nadzemná časť (teplný stres).



Obr. 26: Množstvo Hsp70 získané denzitometrickým vyhodnotením bandov z obrázku 25 s využitím programu ImageJ. Použitým rastlinným materiálom boli kontrolné a teplom stresované korene a nadzemné časti genotypu Trendy zozbierané hneď po vystavení stresu.

4.4.3 Stanovenia množstva Hsp70 metódou ELISA (komerčný kit)

V poslednom rade bolo množstvo Hsp70 v rastlinných vzorkách analyzované pomocou komerčne dostupného kitu. Informácie o kите, rovnako ako aj podrobný manuál pre jeho použitie je súčasťou prílohy 1. Množstvo Hsp70 bolo prepočítané na relatívne jednotky a hodnota jedna bola opäť priradená napestovanému kalibrátoru (obr. 27). Z výsledkov bolo možné pozorovať opačný trend ako pri výsledkoch, ktoré boli získané optimalizovanou metódou ELISA a metódou Western blot. Vo vzorkách koreňa, či už kontrolného alebo stresovaného teplom, bolo množstvo Hsp70 mnohonásobne väčšie ako v ostatných vzorkách. Hodnota jeho absorbancie stanovovaná pri 450 nm bola mimo hornú hranicu detekcie spektrofotometra. V porovnaní s ďalšími dvomi použitými metódami nebol u nadzemnej časti pozorovaný pozitívny efekt tepelného stresu na produkciu Hsp70. Výsledky získané použitím komerčného kitu neodpovedali výsledkom, ktoré boli dosiahnuté využitím metódy ELISA a Western blot, a preto nebolo vhodné pracovať s komerčným kitom a používať ho pre stanovenie množstva Hsp70 v ďalších vzorkách. Taktiež hodnota koncentrácie Hsp70 pre kalibrátor stanovená v kapitole 4.3 nemusí byť zrejme správna, a preto sa s ňou ďalej ani nepočíta. Množstvo Hsp70 stanovované optimalizovanou metódou ELISA sa tak stále prepočítava na relatívne jednotky.



Obr. 27: Stanovenie množstva Hsp70 použitím komerčne dostupného kitu. Použitým rastlinným materiálom boli kontrolné a teplom stresované korene a nadzemné časti genotypu Trendy zozbierané hneď po vystavení stresu. * = Nd – nedetegované – prekročená horná hranica detekcie spektrofotometra.

4.5 Aplikácia optimalizovanej ELISA metódy pre stanovenie množstva Hsp70 v hrachu siatom po vystavení tepelnému a chladovému stresu

Optimalizovaná ELISA metóda (príloha 2) bola aplikovaná pre štúdium produkcie Hsp70 vo vzorkách pripravených zo semenáčikov hrachu vystavených tepelnému a chladovému stresu. K štúdiu produkcie Hsp70 boli použité tri genotypy hrachu siatého Arkta, Arvika a Trendy. Zvlášť boli testované korene a nadzemné časti, sledovali sa zmeny v produkcii Hsp70 v stresovaných rastlinách voči rastlinám kontrolným v časových intervaloch 0; 0,5; 1; 2; 4 a 24 hodín po vystavení stresu. Použitý bol interný štandard pre prepočet relatívneho množstva Hsp70, kedy hodnota jedna bola vždy priradená internému štandardu a pre každú vzorku bol použitý vlastný blank (viď. kap. 4.2.6). Všetky merania boli zopakované trikrát.

Stanovené množstvo Hsp70 optimalizovanou metódou ELISA v koreňoch a nadzemných častiach genotypu Arkta je znázornené na obrázku 28. Vzorky koreňov zozbierané hneď po vystavení tepelnému aj chladovému stresu nevykazovali výrazné zmeny v množstve Hsp70 voči kontrole. U koreňov kontrolných rastlín došlo po odtemnení rastlín k miernemu nárastu produkcie Hsp70 v čase 0 – 2 hodiny. Potom hodnota Hsp70 mierne klesala a po 24 hodinách bolo pozorované najviac Hsp70 v koreňoch kontrolných rastlín. V koreňoch rastlín vystavených tepelnému stresu došlo k nárastu produkcie Hsp70 pol hodiny od vystavenia stresu, kedy s postupom času koncentrácia Hsp70 v koreňoch klesala. Najvyššia produkcia Hsp70 v koreňoch teplom stresovaných rastlín bola pozorovaná pol hodinu po vystavení stresu v porovnaní s kontrolnými koreňmi. Korene rastlín vystavených chladovému stresu vykazovali pokles množstva Hsp70 pol hodiny po vystavení stresu, potom produkcia výrazne vzrástla, najviac Hsp70 bolo nameraných 1 hodinu po vystavení stresu, a potom postupne klesala.

Množstvo Hsp70, v nadzemnej časti genotypu Arkta zozbieranej hneď po vystavení stresu, vzrástlo voči kontrole vo vzorke stresovanej teplom aj chladom. V kontrolných vzorkách sa množstvo Hsp70 v čase nemenilo (obr. 28). Nadzemné časti rastlín vystavených tepelnému stresu vykazovali nárast Hsp70 voči kontrole len v časoch 0 a 1 hodina. Pri nadzemnej časti rastlín vystavených chladovému stresu bol zaznamenaný len mierny pokles produkcie Hsp70 v čase 0 – 4 hodiny. Vyššie množstvo Hsp70 bolo detegované po 24 hodinách v porovnaní s kontrolou.

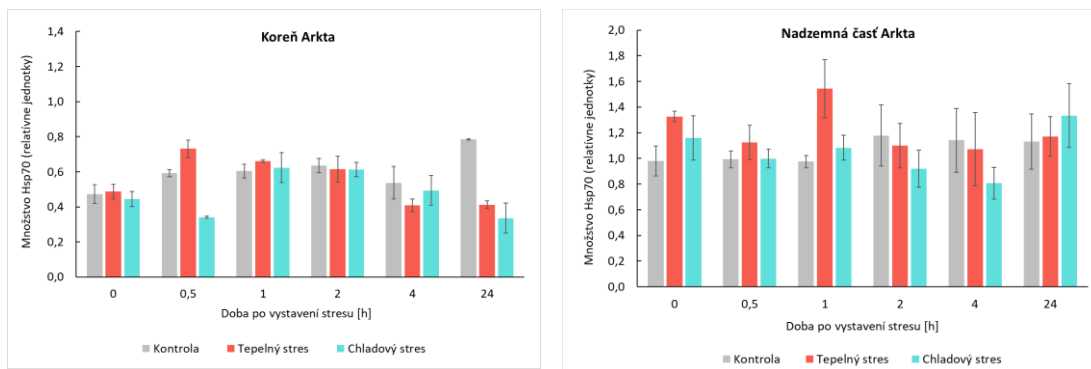
Hladina Hsp70 v koreňoch a nadzemných častiach hrachu siateho genotypu Arvika bola stanovená optimalizovanou metódou ELISA (obr. 29). V koreňoch zozbieraných hneď po vystavení stresu bolo množstvo Hsp70 vyššie v koreňoch rastlín stresovaných teplom v porovnaní s koreňmi kontrolných rastlín, zatiaľ čo množstvo Hsp70 v koreňoch stresovaných chladom bolo voči kontrole nižšie. Kontrolné vzorky koreňa vykazovali nárast množstva Hsp70 od 0 – 2 hodiny, a následne množstvo Hsp70 pokleslo. U koreňov rastlín stresovaných teplom bol pozorovaný prudký nárast hneď po vystavení stresu. Vysoká hladina Hsp70 bola až do 1 hodiny, potom množstvo Hsp70 kleslo. Korene rastlín stresovaných chladom hneď po vystavení stresu vykazovali pokles produkcie Hsp70. Následne bol zaznamenaný vysoký nárast množstva Hsp70 v čase 0,5 – 2 hodiny po strese, potom došlo k poklesu.

Produkcia Hsp70, stanovená optimalizovanou metódou ELISA, v nadzemnej časti genotypu Arvika bola hneď po vystavení stresu vyššia v nadzemnej časti vystavenej tepelnému stresu a nižšia v nadzemnej časti stresovanej chladom voči kontrole (obr. 29). V kontrolných vzorkách bol pozorovaný mierny nárast množstva Hsp70 do 1 hodiny, potom postupný pokles. Najväčší nárast produkcie Hsp70 u rastlín vystavených tepelnému stresu bol 2 hodiny od vystavenia, následne produkcia klesala. Chladom stresované nadzemné časti genotypu Arvika vykazovali pozvoľný nárast množstva Hsp70 až do 4 hodín, potom hladina Hsp70 postupne klesala.

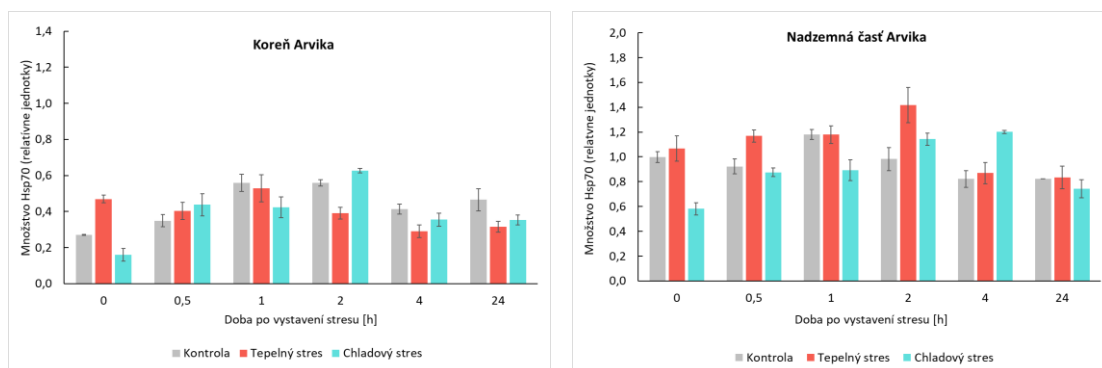
Množstvo Hsp70 v genotype Trendy, v koreni a nadzemnej časti, bolo stanovené optimalizovanou metódou ELISA (obr. 30). Hneď po vystavení stresu bolo množstvo Hsp70 vyššie v teplom stresovanej vzorke a nižšie vo vzorke stresovanej chladom, voči kontrole. U kontrolných koreňov došlo pol hodinu po odtemnení k výraznejšiemu poklesu Hsp70, následne množstvo Hsp70 postupne vzrástlo. Korene rastlín vystavené tepelnému stresu vykazovali mierny nárast Hsp70 do 1 hodiny od stresu, potom množstvo klesalo. V chladom stresovaných koreňoch genotypu Trendy bol pozorovaný pokles produkcie Hsp70 do 0,5 hodiny, a potom došlo k nárastu množstva Hsp70, pričom najviac Hsp70 bolo v koreňoch rastlín vystavených chladovému stresu po 24 hodinách.

Nadzemné časti genotypu Trendy hneď po vystavení obom typom stresu vykazovali nárast množstva Hsp70 voči kontrole (obr. 30). Vzorky nadzemnej časti kontrolných rastlín vykazovali po odtemnení prudký pokles hladiny Hsp70, následne množstvo Hsp70 do 1 hodiny vzrástlo a postupom času mierne pokleslo. U rastlín vystavených tepelnému stresu produkcia Hsp70 rástla do 1 hodiny, potom mierne poklesla. Nadzemné časti rastlín

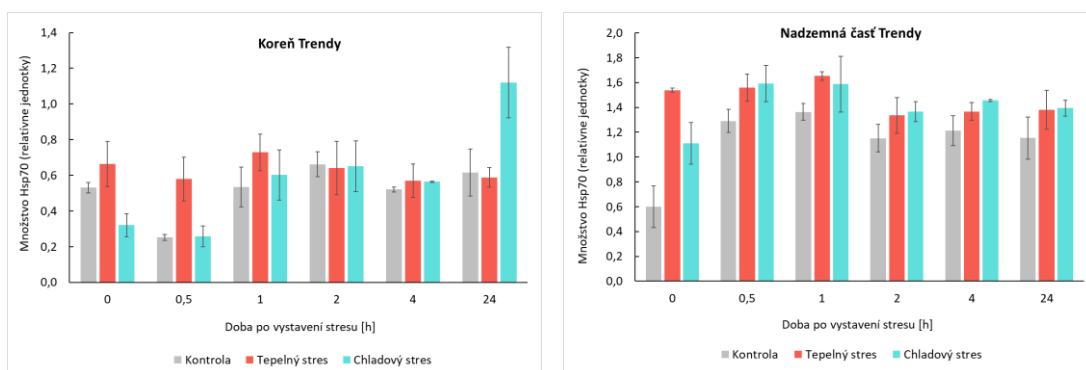
vystavených chladovému stresu vykazovali pokles hladiny Hsp70 hneď po vystavení stresu, následne hladina Hsp70 do 1 hodiny vzrástla a priebehom času opäť mierne klesla.



Obr. 28: Množstvo Hsp70 v koreňoch a nadzemných častiach genotypu Arka po vystavení tepelnému a chladovému stresu. Vzorky boli zozbierané v časových rozmedziach od 0 – 24 hodín po vystavení stresu.



Obr. 29: Množstvo Hsp70 v koreňoch a nadzemných častiach genotypu Arvika po vystavení tepelnému a chladovému stresu. Vzorky boli zozbierané v časových rozmedziach od 0 – 24 hodín po vystavení stresu.



Obr. 30: Množstvo Hsp70 v koreňoch a nadzemných častiach genotypu Trendy po vystavení tepelnému a chladovému stresu. Vzorky boli zozbierané v časových rozmedziach od 0 – 24 hodín po vystavení stresu.

5 DISKUSIA

Rastliny sú v prírode často vystavené rôznym druhom abiotického stresu vrátane nízkej alebo vysokej teploty, nedostatku alebo prebytku vody, vysokej salinite či ťažkým kovom. Spomedzi spomínaných stresov má tepelný stres významný vplyv na rast a metabolizmus rastlín. V reakcii na tepelný stres si rastliny syntetizujú molekulárne chaperóny vrátane Hsps, ktoré sa rozdeľujú na základe ich molekulovej hmotnosti na päť tried: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé Hsp (Kang et al., 2022).

Na pracovisku katedry biochémie PĚF UP sa v rámci štúdií zameraných na obranné reakcie rastlín používa pre detekciu Hsp70 metóda Western blot. Cieľom mojej diplomovej práce bolo optimalizovať a vytvoriť funkčný protokol pre stanovenie a kvantifikáciu Hsp70 metódou ELISA v rastlinných vzorkách. Následne optimalizovanú metódu použiť pre stanovenie Hsp70 v rastlinnom materiáli hrachu, konkrétne v troch genotypoch: Arkta, Arvika a Trendy. K detekcii Hsp70 sa používajú aj kity, ktoré sú komerčne dostupné, ale hlavne sú pripravené pre detekciu živočíšnych a ľudských Hsps, napr. <https://www.baria.cz/z3578496-elisa-kit-for-heat-shock-protein-70-hsp70-96t> alebo <https://www.abcam.com/en-cz/products/assay-kits/heat-shock-protein-assay-kit-fluorometric-ab284527>. Pre detekciu v rastlinnom materiáli bol nájdený len ELISA kit firmy MyBioSource (vid'. príloha 1), ktorý bol zakúpený a použitý počas riešenia diplomovej práce.

Analýza Hsp70 v nadzemných častiach teplom stresovaných rastlín hrachu siateho genotypu Arvika a Trendy metódou Western blot, preukázala prítomnosť novo produkovaného Hsp70 o vyššej molekulovej hmotnosti. V kontrolných vzorkách sa prítomnosť Hsp70 o vyššej molekulovej hmotnosti neprejavila. Pri stanovení Hsp70 bola použitá primárna polyklonálna protilátka riedená 1:5000, 1:7500 a 1:10000. Rovnaké výsledky pozorovali aj Piterková et al. (2013) v paradajke, konkrétne v dvoch genotypoch *Solanum lycopersicum* cv. Amateur a *Solanum chmielewskii*. V oboch skúmaných genotypoch paradajky bola akumulácia Hsp70 s vyššou molekulovou hmotnosťou 75 kDa typická len pre vzorky vystavené tepelnému stresu.

Prvý krok optimalizácie metódy ELISA bol zameraný na výber vhodnej doštičky s najlepšou väzobnou schopnosťou pre Hsp70. Pri optimalizácii sa vychádzalo z postupu, ktorý je na Katedre biochémie bežne používaný pre stanovenie včelích antimikrobiálnych peptidov metódou ELISA. V rámci optimalizácie boli porovnávané 96-jamková ELISA doštička Corning Costar a ImmunoPlate F96 Nunc, Maxisorp. Na základe výsledkov

z výberu vhodnej ELISA doštičky bola zvolená 96-jamková Corning Costar doštička vďaka lepšej väzobnej schopnosti pre Hsp70.

Pre prípravu a použitie vzoriek rastlinného materiálu bolo nutné zvoliť vhodný väzbový pufo. Cieľom vhodného väzbového pufru je, aby proteín mal čo najviac hydrofóbných oblastí, ktorými sa môže viazať na doštičku. Podľa štúdií (Beckman et al., 1994; Ireland et al., 2004) boli testované dva typy pufov – uhličitanový pufo o pH v rozsahu 7,5-10,5 a K-fosfátový pufo o pH 7. Z dosiahnutých výsledkov vyplynulo, že pre študovaný rastlinný materiál je vhodné použitie uhličitanového pufru o pH 9,6. Podobné výsledky získali aj Beckman et al. (1994).

Z dôvodu, že nie je k dispozícii štandard pre rastlinné Hsp70 o známej koncentrácii, bol v priebehu optimalizačných pokusov aj pri realizácii experimentov využívajúcich ELISA metódu pre štúdium Hsp70 u rastlín vystavených tepelnému a chladovému stresu pripravený tzv. kalibrátor. Pre výber vhodného riedenia vzoriek boli použité riedenia 600x – 1600x. Za najvhodnejšie riedenie kalibrátora aj samotných vzoriek bolo zvolené riedenie 1000x, pretože pri riedeniach 600x a 800x bola hodnota absorbie, nameraná pri 450 nm, vyššia ako hodnota 1.

Ďalším krokom pri optimalizácii bolo testovanie blokačného činidla, ktoré zahŕňalo dva proteínové blokátory (mlieko, BSA), buď samotné alebo s prídavkom neionogénneho detergentu (Tween 20). Narozdiel od Beckman et al. (1994), kde využívali na zablokovanie roztok sušeného mlieka, tak pre zablokovanie voľných miest pri práci s rastlinným materiálom hrachu, vychádzalo ako najlepšie blokačné činidlo roztok BSA s prídavkom neionogénneho detergentu Tweenu 20.

Nasledujúcim testovaným parametrom pri optimalizácii ELISA metódy bolo riedenie primárnej polyklonálnej protilátky Hsp70 (cytoplazmatická) produkovanej v zajacovi. Na základe odporúčaní výrobcu (https://www.agrisera.com/cgi-bin/ibutik/SkapaFaktura.pl?SkrivPDF=J&Sprak=EN&Friendly_Grupp=heat-shock&funk=visa_artikel&artgrp=57&Friendly=hsp70-heat-shock-protein-70-cytoplasmic&skrivpdf=j&artnr=AS08%20371) bolo vhodné riedenie primárnej polyklonálnej Hsp70 protilátky od 1:3000 – 1:10000. Pilotné experimenty testovania vhodného riedenia (1:5000, 1:7500 a 1:10000) primárnej polyklonálnej protilátky boli realizované pri stanovení metódy Western blot, kedy sa javilo ako optimálne riedenie 1:10000. Podľa už zavedenej metódy Western blot, bola na membránach použitá sekundárna protilátka značená alkalickou fosfatázou. V prípade metódy ELISA boli k zisteniu použité riedenia 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500 a 1:10000. Optimalizáciou

bolo za najvhodnejšie zvolené riedenie 1:5000 pre metódu ELISA, zatiaľ čo Hýsková et al. (2021b) použili pre metódu ELISA riedenie tej istej primárnej polyklonálnej protilátky 1:3000. Intenzita signálu bola dostatočná a súčasne sme sa snažili aby bola metóda ekonomicky výhodná (cena za 50 μ l protilátky je približne 320 € - 8085 Kč, množstvo protilátky použiteľné na cca 41 experimentov, v prípade využitia celej 96-jamkovej ELISA doštičky). Na rozdiel od použitej sekundárnej protilátky pri metóde Western blot, pri metóde ELISA bola využitá sekundárna protilátka značená peroxidázou. Na základe výsledkov z optimalizačných experimentov bol vypracovaný podrobný protokol „Stanovenie množstva Hsp70 v semenáčikoch hrachu pomocou ELISA metódy“, ktorý je uvedený v prílohe 2.

Metóda ELISA a aj metóda Western blot patria medzi nepriame metódy, ktoré je možné použiť na detekciu prítomnosti proteínu vo vzorke. Obe metódy majú svoje výhody aj nevýhody. Sadeq et al. (2023) uviedli, že metóda ELISA je oveľa rýchlejšia, lacnejšia a vyžaduje si malú zručnosť, zatiaľ čo metóda Western blot je zložitejšia a vyžaduje si viac skúseností. V dôsledku toho sa Western blot používa vo výskume na potvrdenie výsledkov ELISA metódy. Rovnako aj v diplomovej práci boli uvedené metódy porovnané a z výsledkov vyplýva, že dáta získané oboma metódami sú zrovnateľné. Gavini a Parameshwaren (2023) uviedli, že Western blot je časovo náročná metóda a v prípade nedodržania potrebného času, môže dôjsť k skresleniu výsledkov. Taktiež nedostatočný čas prenosu môže spôsobiť, že väčšie proteíny sa neprenesú z gélu na membránu. Ako ďalšia možná nevýhoda je aj to, že Western blot je semikvantitatívna metóda, a preto sa z výsledku dá len približne odhadnúť, nie presne určiť, molekulová hmotnosť proteínu. Sakamoto et al. (2018) popísali, že nevýhodou metódy ELISA môže byť vysoká možnosť falošne pozitívnych alebo negatívnych výsledkov z dôvodu nedostatočného blokovania povrchu mikrotitračnej doštičky imobilizovanej antigénom. Naopak, ako výhody uviedli jednoduchý postup, vysokú účinnosť, pretože analýzy sa môžu vykonávať bez komplikovanej úpravy vzoriek či vysokú špecifickosť a citlivosť vďaka reakcii antigén-protilátka. To, že metóda ELISA má vysokú citlivosť voči Western blotu bolo dokázané aj v diplomovej práci. S využitím metódy ELISA, bolo možné stanoviť relatívne množstvo Hsp70 v koreni genotypu Arvika, zatiaľ čo pri použití Western blotu neboli Hsp70 detegované ani v kontrolnej ani teplom stresovanej vzorke.

Mészáros, É. (2022) vo svojom článku uviedla, že ak chceme získať spoľahlivé kvantitatívne údaje z použitia metódy ELISA, je možné zostaviť kalibračnú krivku.

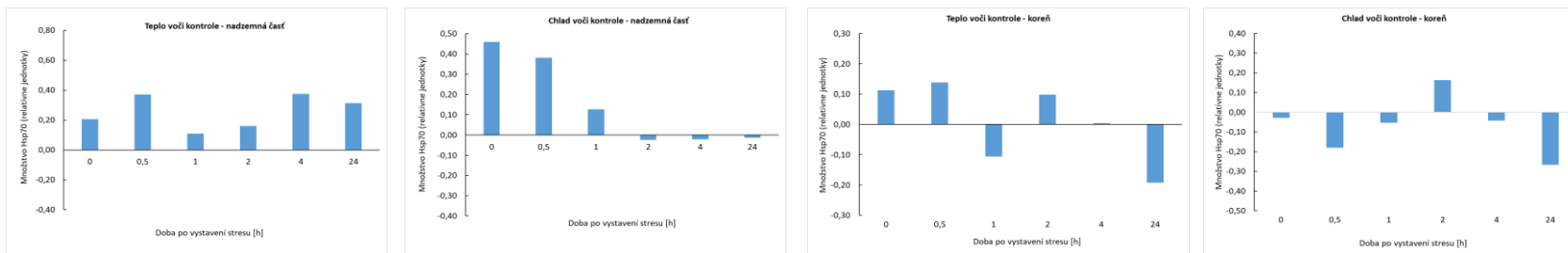
K zostrojeniu grafu kalibračnej krivky sa využije sériové riedenie stanovovaného typu proteínu o známej koncentrácii. Pre porovnanie metodických prístupov bol zakúpený komerčný ELISA kit. Výrobca v manuáli uvádzal, že kit je možné použiť na rastlinné vzorky. Pomocou štandardov, ktoré boli súčasťou kitu bola stanovená koncentrácia Hsp70 v pripravenom kalibrátore. Kit bol použitý aj pre stanovenie koncentrácie Hsp70 vo vzorkách hrachu siateho. Napriek tomu, že komerčný kit bol deklarovaný ako vhodný pre detekciu Hsp70 v rastlinných vzorkách, získané výsledky neodpovedali výsledkom, získaným využitím metódy ELISA a metódy Western blot. Kit umožňoval realizáciu približne 8 stanovení a jeho cena bola cca 1580 € - 40 000 Kč. Z dôvodov ekonomickej náročnosti a súčasne v dôsledku získania nekorešpondujúcich výsledkov s optimalizovanou metódou ELISA a už dlhodobo zavedenou metódou Western blot na pracovisku, nebolo vhodné s komerčným kitom ďalej pracovať a používať ho pre stanovenie množstva Hsp70 v ďalších vzorkách. Otáznou je aj správnosť stanovenia koncentrácie Hsp70 v kalibrátore, preto by bolo nutné pre dosiahnutie adekvátnych výsledkov použiť iný štandard Hsp70, napríklad ľudský, o známej koncentrácii.

V štúdií vypracovanej Ni et al. (2021), bola študovaná expresia génu *GhHSP70-26*, ktorý kóduje Hsp70 v bavlníku. Hladina transkriptu bola vyššia v listoch bavlníku ako v jeho koreňoch. Podobné zistenie vyplývalo aj z výsledkov stanovenia množstva Hsp70 v jednotlivých genotypoch hrachu, pričom vo všeobecnosti bolo relatívne množstvo Hsp70 vyššie v nadzemnej časti, obsahujúcej aj listy, ako v koreňoch rastlín. Ďalej vo svojej štúdií Ni et al. (2021) zistili, že gén *GhHSP70-26* reaguje na transkripčnej úrovni na vystavenie tepelnému alebo chladovému stresu. Bolo pozorované, že relatívna expresia génu, ktorý kóduje Hsp70, po vystavení tepelnému stresu bola najvyššia po dvoch hodinách od vystavenia. Podobné výsledky boli dokázané aj u genotypu hrachu Arvika, kedy tiež bolo relatívne množstvo Hsp70 najvyššie v nadzemnej časti po dvoch hodinách od vystavenia tepelnému stresu. Pri vystavení rastlín bavlníka chladovému stresu bola relatívna expresia najvyššia po šiestich hodinách od vystavenia. V prípade hrachu boli obdobné výsledky sledované u genotypu Arvika v nadzemnej časti po štyroch hodinách.

V rámci stanovenia zmeny produkcie Hsp70 v hrachu siatom vystavenom tepelnému a chladovému stresu boli porovnané tri genotypy Arkta (obr. 31), Arvika (obr. 32) a Trendy (obr. 33). Z výsledkov prezentovaných v kapitole 4.5 bol vypočítaný pokles/nárast produkcie Hsp70 u stresovaných rastlín voči kontrolným vzorkám. Signifikantný výsledok bol pozorovaný u genotypu Arkta v nadzemnej časti vystavenej

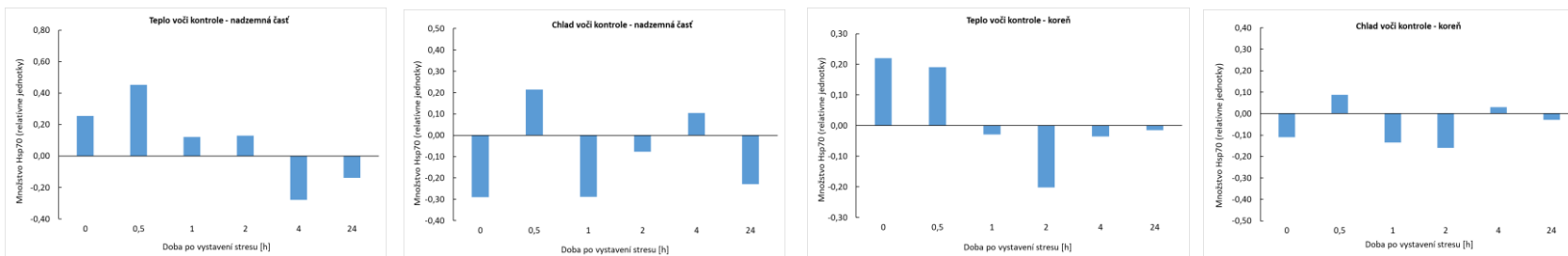
chladovému stresu (obr. 31). Najvyššia hladina Hsp70 bola zaznamenaná hneď po vystavení stresu a postupom času klesala. Genotyp Arkta patrí medzi ozimné odrody hrachu siateho a bol vyšľachtený firmou Selgen a.s. Vyznačuje sa schopnosťou dobrého prezimovania a odolnosťou voči mrazu. Ďalším, veľmi zaujímavým pozorovaním bola odlišná reakcia na stres vyvolaný teplom alebo chladom vo forme produkcie Hsp70 u semenáčikov záhradného hrachu Trendy v porovnaní s kýmymi hrachmi Arktou a Arvikou. U genotypu Trendy bolo namerané väčšie množstvo Hsp70 v nadzemných častiach vystavených ako teplu, tak aj chladu. V koreňoch tohto genotypu bol zaznamenaný pokles, resp. nárast po tepelnom strese, a taktiež pokles resp. nárast aj po chladovom strese, zatiaľ čo u ďalších dvoch študovaných genotypov nebol pozorovaný žiadny významný trend.

ARKTA



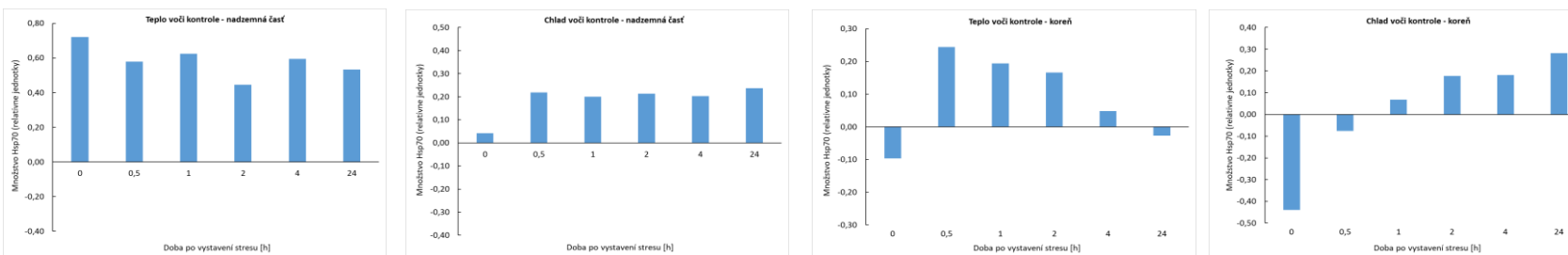
Obr. 31: Porovnanie relatívneho množstva Hsp70 u genotypu Arkta v koreni a nadzemnej časti voči kontrole v čase 0 – 24 hodín od vystavenia stresu.

ARVIKA



Obr. 32: Porovnanie relatívneho množstva Hsp70 u genotypu Arvika v koreni a nadzemnej časti voči kontrole v čase 0 – 24 hodín od vystavenia stresu.

TRENDY



Obr. 33: Porovnanie relatívneho množstva Hsp70 u genotypu Trendy v koreni a nadzemnej časti voči kontrole v čase 0 – 24 hodín od vystavenia stresu.

6 ZÁVER

Úvod diplomovej práce bol venovaný literárnej rešerši, ktorá bola zameraná na Hsps rozdelené podľa molekulovej hmotnosti na Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 a malé Hsps. Podrobnejšie charakterizovaná bola trieda Hsp70, ich štruktúra a funkcia. V rámci teoretickej časti bola taktiež popísaná metóda ELISA, jej rozdelenie a využitie a metóda Western blot s imunodetekciou.

V experimentálnej časti bol pestovaný a spracovaný rastlinný materiál troch genotypov hrachu siateho Arkta, Arvika a Trendy, ktorý bol vystavený chladovému a tepelnému stresu. Rastlinný materiál bol následne zozbieraný v časových rozmedziach 0 – 24 hodín od vystavenia stresu a slúžil k stanoveniu množstva Hsp70 zavedenou a optimalizovanou metódou ELISA. Okrem toho, bolo množstvo Hsp70 stanovené aj metódou Western blot a pomocou komerčného kitu.

Výsledky získané Western blot analýzou preukázali, že primárna polyklonálna protilátka je špecifickejšia voči rastlinným Hsp70 ako monoklonálna protilátka. V porovnaní s metódou Western blot bola optimalizovaná metóda ELISA citlivejšia na stanovenie množstva Hsp70 v hrachu siatom, ale výsledky vzájomne korelovali. U všetkých genotypov bola metódou ELISA stanovená vyššia hladina Hsp70 v nadzemných častiach v porovnaní s množstvom Hsp70 v koreňoch, čo môže znamenať, že tepelný stres predstavuje pre nadzemné časti väčšiu záťaž a akumulujú sa tam viac. Vzhľadom na použitie kitu, ktorý mal slúžiť k stanoveniu rastlinných Hsp70, neboli dosiahnuté výsledky adekvátne, a preto nebol komerčný kit použitý k stanoveniu koncentrácie Hsp70 v rastlinnom materiáli.

Nadzemné časti a korene rastlín vystavených tepelnému a chladovému stresu vykazovali rozdielne hladiny Hsp70 porovnaním genotypov Arkta, Arvika a Trendy. Zvýšené množstvo Hsp70 v nadzemnej časti ozimného genotypu Arkta hneď po vystavení stresu môže mať za úlohu pomáhať rastline čeliť nízkym teplotám a prežiť aj v nepriaznivých podmienkach. Naopak, genotypy Arvika a Trendy nepatria medzi ozimné odrody, preto u nich nebol pozorovaný nárast množstva Hsp70 po vystavení chladovému stresu.

Získané výsledky môžu dopomôcť k porozumeniu funkcie a významu Hsp70 nielen v hrachu siatom, ale aj inom rastlinnom materiáli, ktorý môže byť okrem tepelného a chladového stresu, vystavený ďalším typom abiotického stresu. K stanoveniu množstva Hsp70 v nasledujúcich štúdiách môže byť využitá optimalizovaná metóda ELISA.

7 LITERATÚRA

- Abcam. <https://www.abcam.com/en-cz/products/assay-kits/heat-shock-protein-assay-kit-fluorometric-ab284527> (15.4.2024)
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochem (Lond)*, 42(3), 48-53. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Aghaie, P., & Tafreshi, S. A. H. (2020). Central role of 70-kDa heat shock protein in adaptation of plants to drought stress. *Cell Stress and Chaperones*, 25, 1071–1081. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01144-7>
- Agrisera. https://www.agrisera.com/cgi-bin/ibutik/SkapaFaktura.pl?SkrivPDF=J&Sprak=EN&Friendly_Grupp=heat-shock&funk=visa_artikel&artgrp=57&Friendly=hsp70-heat-shock-protein-70-cytoplasmic&skrivpdf=j&artnr=AS08%20371 (15.4.2024)
- Alhaji, M., Zubair, M., Farhana, A. (2023). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
- Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University-Science*, 23(2), 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022>
- Baria. <https://www.baria.cz/z3578496-elisa-kit-for-heat-shock-protein-70-hsp70-96t> (15.4.2024)
- Batool, F., Agossa, B. A., Sandhu, Z. Y., Sarwar, M. B., Hassan, S., & Rashid, B. (2022). Heat Shock Proteins (HSP70) Gene: Plant Transcriptomic Oven in the Hot Desert. In J. Ngui Kimatu, *Advances in Plant Defense Mechanisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105391>
- Beck, E. H., Heim, R., Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *Journal of biosciences*, 29, 449-459.
- Beckman, K. B., Harrison, J. G., Ingram, D. S. (1994). Optimization of a polyclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of fungal biomass for use in studies of plant defence responses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 44(1), 19-32. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(05\)80092-X](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(05)80092-X)
- Berka, M., Kopecká, R., Berková, V., Brzobohatý, B., Černý, M. (2022). Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity. *Journal of Experimental Botany*, 73(7), 1894-1909. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab549>
- Bierkens, J., Maes, J., Plaetse, F. V. (1998). Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environmental Pollution*, 101(1), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00010-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00010-4)
- Bishai, F. R., & Galli, R. (1978). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 8(6), 648-656. <https://doi.org/10.1128/jcm.8.6.648-656.1978>
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Cazalé, A. C., Clément, M., Chiarenza, S., Roncato, M. A., Pochon, N., Creff, A., Marin, E., Leonhardt, N., Noël, L, D. (2009). Altered expression of cytosolic/nuclear HSC70-1 molecular chaperone affects development and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(9), 2653–2664. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp109>
- Clark, B. R., & Engvall, E. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In Maggio, E. T., *Enzyme Immunoassay* (1. edition, 167-180). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351071840>
- Devi, J., Sagar, V., Mishra, G. P., Jha, P. K., Gupta, N., Dubey, R. K., Singh, P. M., Behera, T. K., Prasad, P. V. (2023). Heat stress tolerance in peas (*Pisum sativum* L.): Current status and way forward. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1108276>
- Dragovic, Z., Broadley, S. A., Shomura, Y., Bracher, A., Hartl, F. U. (2006). Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *The EMBO Journal*, 25(11), 2519-2528. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601138>

- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., Sadia, S., Nasim, W., Adkins, S., Saud, S., et al. (2017). Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01147>
- Firmansyah, F., & Argosubekti, N. (2020). A review of heat stress signaling in plants. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 484. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/484/1/012041>
- Francini, A., & Sebastiani, L. (2019). Abiotic Stress Effects on Performance of Horticultural Crops. *Horticulturae*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/horticulturae5040067>
- Gavini, K., & Parameshwaren, K. (2023). Western Blot. In: StatPearls (Internet). Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807–1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Guo, M., Liu, J. H., Ma, X., Luo, D. X., Gong, Z. H., Lu, M. H. (2016). The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00114>
<https://theory.labster.com/types-elisa/> (2.12.2022)
- Hagiwara, M. (2022). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting analyses via colored stacking gels. *Analytical Biochemistry*, 652. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114751>
- Hänninen, A. L., Simola, M., Saris, N., Makarow, M. (1999). The cytoplasmic chaperone hsp104 is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell*, 10(11), 3623–3632. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3623>
- Hossain, Z., Makino, T., Komatsu, S. (2012a). Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. *Journal of Proteomics*, 75(13), 4151–4164. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.037>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J. A., Fujita, M. (2012b). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3). <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
- Hussain, S., Junaid Rao, M., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., Ahmad, S. (2019). Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants Under Drought Conditions. *Plant Abiotic Stress Tolerance*, 207–219. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9
- Hýsková, V., Bělonožníková, K., Čerovská, N., Ryšlavá, H. (2021a). HSP70 plays an ambiguous role during viral infections in plants. *Biologia Plantarum*, 65(1), 68–79. <https://doi.org/10.32615/bp.2021.001>
- Hýsková, V., Bělonožníková, K., Doričová, V., Kavan, D., Gillarová, S., Henke, S., Synková, H., Ryšlavá, H., Čerovská, N. (2021b). Effects of heat treatment on metabolism of tobacco plants infected with *Potato virus Y*. *Plant Biology*, 23(1), 131–141. <https://doi.org/10.1111/plb.13234>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Imran, Q. M., Falak, N., Hussain, A., Mun B. G., Yun, B. W. (2021). Abiotic Stress in Plants; Stress Perception to Molecular Response and Role of Biotechnological Tools in Stress Resistance. *Agronomy*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081579>
- Ireland, H. E., Harding, S. J., Bonwick, G. A., Jones, M., Smith, Ch. J., Williams, J. H. H. (2004). Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers*, 9(2), 139–155. <https://doi.org/10.1080/13547500410001732610>

- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. M. (2019). Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Janmohammadi, M., Zolla, L., Rinalducci, S. (2015). Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry*, 117, 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.003>
- Jee, H. (2016). Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 12(4), 255-259. <https://doi.org/10.12965/jer.1632642.321>
- Kang, Y., Lee, K., Hoshikawa, K., Kang, M., Jang, S. (2022). Molecular Bases of Heat Stress Responses in Vegetable Crops With Focusing on Heat Shock Factors and Heat Shock Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.837152>
- Khan, S., Jabeen, R., Deeba, F., Waheed, U., Khanum, P., Iqbal, N. (2021). Heat Shock Proteins: Classification, Functions and Expressions in Plants during Environmental Stresses. *Journal of Bioresource Management*, 8(2). <https://doi.org/10.35691/JBM.1202.0183>
- Kohler, V., & Andréasson, C. (2020). Hsp70-mediated quality control: should I stay or should I go? *Biological Chemistry*, 401(11), 1233-1248. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0187>
- Koivunen, M. E., & Krogsrud, R. L. (2006). Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8), 490-497. <https://doi.org/10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Krause, T., Jolkver, E., Bruchhaus, S., Kramer, M., Hemmje, M. (2021). An RT-qPCR Data Analysis Platform. In *Proceedings of the Collaborative European Research Conference (CERC 2021)*. <http://ceur-ws.org>
- Kul, R., Ekinci, M., Turan, M., Ors, S., Yildirim, E. (2021). How Abiotic Stress Conditions Affects Plant Roots. In E. Yildirim, M. Turan, M. Ekinci, *Plant Roots* (Eds). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95286>
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.007>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Mahmood, T., & Yang, P. Ch. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Meftahi, G. H., Bahari, Z., Mahmoudabadi, A. Z., Iman, M., Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside, 49(4), 509-517. <https://doi.org/10.1002/bmb.21516>
- Mészáros, É. (2022). ELISA vs western blot: a comparison of two common immunoassays. *Integra*. <https://www.integra-biosciences.com/japan/en/blog/article/elisa-vs-western-blot-comparison-two-common-immunoassays#References>
- Mittler, R., Finka, A., Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>
- Moritz, Ch. P. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103575>
- Murphy, C., O’Kennedy, R., Lysakova-Devine, T. (2016). Technology advancements in antibody purification. *Antibody Technology Journal*, 6, 17-32. <https://doi.org/10.2147/ANTI.S64762>
- Ni, Z., Liu, N., Yu, Y., Bi, Ch., Chen, Q., Qu, Y. (2021). The cotton 70-kDa heat shock protein GhHSP70-26 plays a positive role in the drought stress response. *Environmental and Experimental Botany*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104628>
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics*, 6(5), 1068-1078. <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>

- Park, C. J., & Seo, Y. S. (2015). Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *The plant pathology journal*, 31(4), 323–333. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4056-4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In S. A. Bustin, Ed., *A-Z of Quantitative PCR*, International University Line (IUL), La Jolla, 2004, pp. 89-113.
- Piterková, J., Luhová, L., Mieslerová, B., Lebeda, A., Petřivalský, M. (2013). Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. *Plant Science*, 207, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.010>
- Polenta, G. A., Guidi, S. M., Ambrosi, V., Denoya, G. I. (2020). Comparison of different analytical methods to evaluate the heat shock protein (HSP) response in fruits. Application to tomatoes subjected to stress treatments. *Current Research in Food Science*, 3, 329-338. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.002>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*, 3(8), 955-960.
- Saangi, C. (2021). Types of ELISA-Enzyme Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology*, 11(5). <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/types-of-elisaenzyme-linked-immunosorbent-assays.pdf>
- Sable, A. R., & Agarwal, S. K. (2018). Plant Heat Shock Protein Families: Essential Machinery for Development and Defense. *Journal of Biological Sciences and Medicine*, 4(1), 51-64.
- Sadeghalvad, M., & Rezaei, N. (2021). Introduction on Monoclonal Antibodies. In N. Rezaei, *Monoclonal Antibodies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98378>
- Sadeq, R., Barhoush, S., Al-Adsani, A. M. (2023). Western Blotting Vs. ELISA: The Why, How, and When of Protein Analysis. *Conference: Science Research Poster 2022/2023*. <https://www.researchgate.net/publication/372060407>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72, 32-42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>
- Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I., Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 104-119. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.002>
- Sigma-Aldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/355/029/h5147dat.pdf> (15.4.2024)
- Sule, R., Rivera, G., Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, 75(3), 99-114. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>
- Suleyman, A. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Sung, D. Y., Kaplan, F., Guy, Ch. L. (2001). Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiologia Plantarum*, 113(4), 443-451. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130402.x>
- Szymańska, R., Ślesak, I., Orzechowska, A., Kruk, J. (2017). Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 165-177. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.002>
- Ul Haq, S., Khan, A., Ali, M., Khattak, A. M., Gai, W. X., Zhang, H. X., Wei, A. M., Gong, Z. H. (2019). Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. *International journal of molecular sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215321>

- Usman, M. G., Rafii, M. Y., Martini, M. Y., Yusuff, O. A., Ismail, M. R., & Miah, G. (2017). Molecular analysis of Hsp70 mechanisms in plants and their function in response to stress. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(1), 26-39. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1340546>
- Xu, Z. S., Li, Z. Y., Chen, Y., Chen, M., Li, L. Ch., Ma, Y. Z. (2012). Heat Shock Protein 90 in Plants: Molecular Mechanisms and Roles in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 15706-15723. <https://doi.org/10.3390/ijms131215706>
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 244-252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.03.006>
- Wang, F., Dong, Q., Jiang, H., Zhu, S., Chen, B., Xiang, Y. (2012). Genome-wide analysis of the heat shock transcription factors in *Populus trichocarpa* and *Medicago truncatula*. *Molecular biology reports*, 39, 1877-1886. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0933-9>
- Wu, J., Gao, T., Hu, J., Zhao, L., Yu, Ch., Ma, F. (2022). Research advances in function and regulation mechanisms of plant small heat shock proteins (sHSPs) under environmental stresses. *Science of The Total Environment*, 825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154054>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA	akrylamid
AP	alkalická fosfatáza
APS	persíran amónny
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
β -gal	β -galaktozidáza
BIS	N, N'-metylenbisakrylamid
BSA	hovádzí sérový albumín
CDR	oblasť určujúca komplementaritu (z angl. complementarity-determining region)
C _L	konštantná ľahká oblasť
Clp	kazeínová lytická proteináza (z angl. Casein lytic proteinase)
C _t	C _t hodnota (z angl. threshold cycle)
DBD	DNA viažuca doména (z angl. DNA-binding domain)
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
EIA	enzýmová imunoanalýza
Fab	fragmenty antigén viažucej domény (z angl. Fragment antigen binding domains)
Fc	kryštalizovateľný fragment (z angl. Fragment crystallizable)
GOD	glukozooxidáza
GOI	gén záujmu (z angl. gene of interest)
HRP	chrenová peroxidáza
HSE	elementy tepelného stresu (z angl. heat stress elements)
Hsf	faktor tepelného šoku (z angl. heat shock factor)
Hsps	proteíny tepelného šoku (z angl. Heat shock proteins)
JDP	proteíny s J-doménou (z angl. J domain protein)
NBD	nukleotid viažuca doména
NBT	nitrotetrazoliová modrá (z angl. nitro blue tetrazolium)
NEF	faktor výmeny nukleotidov
NES	jadrový exportný signál (z angl. nuclear export signal)
NLS	jadrový lokalizačný signál (z angl. nuclear localization signal)
OD	oligomerizačná doména
pAb	polyklonálna protilátka (z angl. polyclonal antibody)
PBS	fosfátový pufo (z angl. phosphate buffered saline)
PVDF	polyvinylidenfluorid
RD	represorová doména
ROS	reaktívne formy kyslíka
RT-qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou (z angl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
SBD	substrát viažuca doména
SDS	dodecylsírán sodný
TBS	solný roztok pufrovaný Tris (z angl. Tris-buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidín dihydrochlorid
V _H	variabilný ťažký reťazec
V _L	variabilná ľahká oblasť

9 PRÍLOHY

9.1 Plant Heat Shock Protein 70 (HSP70) ELISA Kit. Cat.No: MBS9370793

Plant Heat Shock Protein 70 (HSP70) ELISA Kit

Cat.No: MBS9370793

Store the kit at 2°C-8°C !

Valid Period: Six Months (2°C-8°C)!

Specification: 48 well kit or 96 well kit

FOR LAB REAGENT/RESEARCH USE ONLY!

NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS!

1. Introductions

This **Quantitative Sandwich ELISA** kit is for lab reagent/research use only, not for drug, household, therapeutic or diagnostic applications! This kit is intended to be used for determine the level of HSP70 (hereafter termed "analyte") in **undiluted original Plant tissue homogenates samples**. For other sample types please contact tech support to determine compatibility with this assay. This kit is not suitable for assaying non-biological sources of substances.

2. Performances

Sensitivity: The sensitivity of this kit is 10pg/ml.

Detection Range: The detection range of this kit is 62.5pg/ml-2000pg/ml.

Standard Concentration Gradients (S6 to S1) : 2000,1000,500,250,125,62.5pg/ml.

Reproducibility: Both Intra-assay CV (%) and Inter-assay CV (%) is less than 15%. [CV(%) = SD/mean × 100]. All CV% should be compared by concentration, not compared by OD values.

3. Precautions

3.1) We reserve the right to amend the terms and conditions of any change without prior notice in this manual.

3.2) Limited by current skill and knowledge, it is impossible for us to complete the cross-reactivity detection between this analyte and all its analogues; therefore, cross reaction to other targets may potentially exist. Furthermore, cross-reactivity could vary between sample type or species.

3.3) Influenced by factors including cell viability, cell number and sampling time, samples from cell culture supernatant/extract or cell lysates are not suitable for detection by this kit.

3.4) Pure buffer controls are not suitable for this one step assay because they do not reflect the contribution of the biological matrix of an endogenous sample to reducing the background of the assay. If a pure buffer blank is required then please do not add the HRP-Conjugate Reagent to the pure buffer blank reaction mixture.

3.5) The reagents and the plate of the kit and its technical parameters are matched and designed for optimal performance only when they are together as a whole kit, so please do not substitute reagents from one kit to other kits and use only the reagents supplied by manufacturer. Due to the possibility of mismatching between antigen/antibody from other manufacturers and antibody/antigen used in this kit (such as differences in conformational epitopes caused by chemical environments or differences in linear epitopes, and so on), some synthetic peptides, recombinant proteins and extracted proteins can not be detected out by this kit. Additionally, we will not be responsible for using this kit or any part of this kit to do any other experiments (such as western blot, immunohistochemistry, spike/recovery and so on) arbitrarily.

3.6) Results from end users might be inconsistent with our in house data due to some unexpected transportation or storage conditions, or different ambient temperature, lab equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age. Assay variance among wells or kits might arise from these factors, too.

3.7) The Stop Solution is an acid solution, please avoid contact it, it may cause skin irritations and burns. so please pay enough attention to safety when use it. Samples should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease. Disposable gloves must be worn during the assay procedure, since no known test method can offer complete assurance that products derived from body will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious and good laboratory practices should be followed.

4. Materials Required but Not Supplied

4.1) Distilled water.

4.2) Absorbent paper or paper towels.

- 4.3) Pipettes and disposable pipette tips.
 4.4) An ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
 4.5) A constant temperature incubator which can provide stable incubation conditions up to 37°C±0.5°C.

5. Materials Supplied

Items	Materials	Color of covers	48 well kit	96 well kit
1	Microelisa Stripplate	---	48 well plate	96 well plate
2	Standards	S1(Red); S2(Pink); S3(Blue); S4(Green); S5(Yellow); S6(White)	0.5ml×6 vials	0.5ml×6 vials
3	Sample Diluent	Blue	3.0ml×1 bottle	6.0ml×1 bottle
4	HRP-Conjugate Reagent	Red	5.0ml×1 bottle	10.0ml×1 bottle
5	20×Wash Solution	White	15ml×1 bottle	25ml×1 bottle
6	Stop Solution	Yellow	3.0ml×1 bottle	6.0ml×1 bottle
7	Chromogen Solution A	Purple	3.0ml×1 bottle	6.0ml×1 bottle
8	Chromogen Solution B	Black or Brown	3.0ml×1 bottle	6.0ml×1 bottle
9	Closure Plate Membrane	---	2×pieces	2×pieces
10	Manual	---	1×paper	1×paper

6. Samples Collection and Storage

Although we have listed most of possible sample types, it does not mean the analyte exists in all of these listed samples, because some analytes only exist in specific body fluids, organelles, cells or tissues. End users have the responsibility to judge whether their samples contain the analyte.

Serum:	Collect and centrifuge serum at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Plasma:	Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge the plasma at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Whole Blood:	Collect whole blood using EDTA or heparin as an anticoagulant, and using ultrasonication or two freeze-thaw cycles to break the cell membranes. Centrifuge the whole blood at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Other Fluid:	Collect and centrifuge fluid at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Tissue:	The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type. Collect and weigh tissue before homogenization, mince the tissue to small pieces and homogenize the tissue with a certain amount of PBS (usually 10mg tissue to 100µl PBS.). Centrifuge the homogenate at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Saliva:	Collect and centrifuge saliva at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Urine:	Collect and centrifuge urine at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.
Feces:	Collect and fully shake feces with a certain amount of PBS (usually 10mg feces to 100µl PBS.). Centrifuge the homogenate at 1000×g (or 3000rpm) for approximately 20 minutes. Collect the supernatant carefully. Assay immediately or store samples at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Important Notes:

- 6.1) We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amounts of samples needed for the entire assay. Please make sure that sufficient samples are available.
 6.2) Fresh samples without long time storage are recommended for the assay. Otherwise, protein degradation and denaturation may occur in the samples and lead to wrong results. Samples to be used within a week can be stored at 2°C-

8°C, otherwise samples should be stored at -20°C(≤three month) or -80°C(≤six months) to help avoid loss of bioactivity and contamination. Avoid repeated freeze/thaw cycles (less than 3 cycles, and no more than 5 cycles). The validity period of samples may vary depending on the analyte, sample type, storage method and other variables.

6.3) There is no unified rules about how long to clot samples after the blood draw. You can clot for 2 hours at room temperature or overnight at 4°C, but it is not necessary to do it.

6.4) Grossly hemolyzed samples are not suitable for use in this assay, so the samples should be centrifuged adequately and no hemolysis or granule is allowed.

6.5) The kit can not assay samples which contain sodium azide (NaN₃), because NaN₃ will inhibit the activity of horseradish peroxidase (HRP).

6.6) If sample types are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of this kit is necessary.

7. Reagent Preparation and Storage

Please store the kits (the Plate and all reagents) at 2°C-8°C.

7.1) The valid period of the unopened kit is up to six months at 2°C-8°C. The kit should not be used beyond the expiration date.

7.2) Wash Solution (1×) - Dilute one volume of Wash Solution (20×) with nineteen volumes of deionized or distilled water. Diluted Wash Solution is stable for one month at 2°C-8°C. Undiluted Wash Solution and other reagents are stable for up to six months at 2°C-8°C.

7.3) When the kit is opened, please use up the plate as soon as possible after removing the plate from the foil pouch, because the plate easily become damp after repeatedly removed it from the foil pouch. The Plate is detachable, so please return the unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal along the entire edge of the zip-seal for preventing moisture. The remaining reagents also need to be stored at 2°C-8°C. The valid period of opened kits may vary depending on various factors and for best results the kit should be used up as soon as possible.

8. Assay Procedures

Steps ↓	Operations
Step 1	Check the Plate and equipment before your experiments and make sure they are no problem. Check the labels and the color of the covers of the vials/bottles and make sure they are matched and no mistake.
Step 2	Allow the Plate , all reagents and samples to come to room temperature (18°C-25°C) naturally before starting assay procedures. Do NOT use hot water baths to heat the Plate, reagents or samples.
Step 3	Removed the Plate from the foil pouch. The Plate is detachable, return the unused strips to the foil pouch with the desiccant pack, and reseal for preventing damp.
Step 4	Set Blank wells; Set Standard wells; Set Sample wells.
Step 5	Add nothing to all Blank wells . Add 50 µl Standard (S₁, S₂, S₃, S₄, S₅, S₆) to corresponding Standard wells . Add 50 µl Sample to every Sample well .
Step 6	Add 100 µl HRP-Conjugate Reagent to every well except blank wells .
Step 7	Cover the Plate with a Closure Plate Membrane and incubate for 60 minutes at 37°C.
Step 8	Wash all wells (including all Blank wells) 4 times.
Step 9	Add 50 µl Chromogen Solution A to every well .
Step 10	Add 50 µl Chromogen Solution B to every well . (Protect Chromogen Solution B from light.)
Step 11	Mix gently and incubate the Plate for 15 minutes at 37°C. (Protect the Plate from light.)
Step 12	Add 50 µl Stop Solution to every well .
Step 13	Read the Optical Density (O.D.) at 450 nm using an ELISA reader within 15 minutes after adding Stop Solution (around 5 minutes is usually the best time).

Important Notes:

8.1) Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent evaporation and contamination with microorganisms.

8.2) Do not remove the Plate from the foil pouch until needed. There may be some foggy substance in the wells when the Plate is opened the first time. This will not have any effect on the final assay results.

8.3) The foil pouch may leak and no longer vacuum after stored or transported for a long distance. This will not have any effect on the final assay results.

8.4) Samples or Reagents Addition: Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall in as much as is possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the Plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all blanks, standards and samples, although not required, is recommended. To avoid contamination, please use fresh disposable pipette tips for each transfer.

8.5) Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of the Plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, Do not let the strips dry at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed. Do not shake during incubation, because shaking may affect the binding reaction of antigen and antibody particularly if not shaking evenly.

8.6) Washing Plate: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the Plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading.

Normally there are two ways of washing: **Manual Washing** and **Automated Washing**

Manual Washing - Dump the incubation mixtures of the wells into a sink or proper waste container. Using a pipette or squirt bottle, fill each well completely with Wash Solution (1×), leave the Wash Solution in the wells for about one minute and then invert and hit the Plate onto absorbent papers or paper towels until no moisture appears. Repeat this procedure four times. **Note:** Hold the sides of the Plate frame firmly when washing the Plate to assure that all strips remain securely in Plate frame.

Automated Washing - Aspirate all wells, then wash the Plate four times using Wash Buffer (1×). Always adjust your washer to aspirate as much liquid as possible and set fill volume at 350µl/well/wash. After the final wash, invert the Plate, and blot the Plate dry by hitting the Plate onto absorbent paper or paper towels until no moisture appears.

8.7) Controlling Reaction Time: Observe the change of color after adding Substrates (e.g. observation once every 10 minutes). Substrates should change from colorless or light blue to gradations of blue. The color developed in the wells will turn from blue to yellow after adding the Stop Solution.

8.8) Chromogen Solution B is 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), and it is easily degraded by sunlight and by fluorescent lights, so please protect it from light.

9. Calculation of Results

9.1) Average the duplicate readings for each standard and sample to subtract average optical density of the Blank (OD₀).

Concentration:	Blank	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
Mean O.D.(450nm):	OD ₀	OD ₁	OD ₂	OD ₃	OD ₄	OD ₅	OD ₆

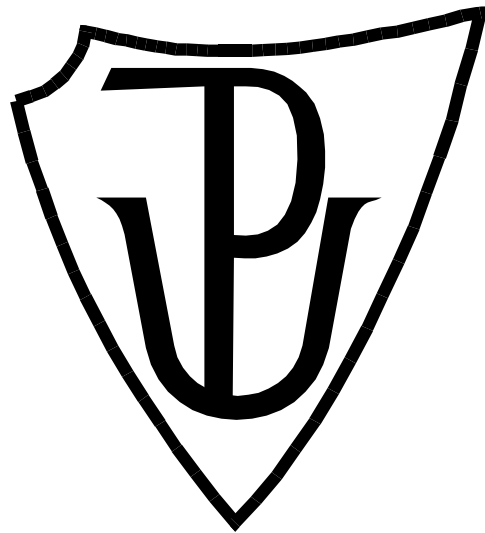
9.2) Use the professional curve fitting software to make the standard curve (usually the standard curve is linear, quadratic and cubic curve) and calculate the level of the analyte.

9.3) If the highest OD value of the samples are higher than the highest OD value of the standards, please dilute the samples with equal or double volume of Sample Diluent and repeat the assay again.

Note: Any variation in ambient temperature, equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age can cause variations in results. Every user should obtain their own standard curve.

**9.2 Stanovenie množstva Hsp70 v semenčikoch hrachu pomocou
ELISA metódy**

**Stanovenie množstva Hsp70 v semenáčikoch
hrachu pomocou ELISA metódy**



Vypracovala: Bc. Martina Sopkuliaková

OBSAH

1	SKRATKY	78
2	PRÍPRAVA VZORIEK	78
2.1	Chemikálie	78
2.2	Príprava pufru použitého pri príprave vzoriek	78
2.3	Postup prípravy vzoriek	78
3	ELISA	79
3.1	Princíp metódy	79
3.2	Použité protilátky	79
3.3	Použité prístroje a experimentálne vybavenie.....	79
3.4	Chemikálie	79
3.5	Príprava roztokov	80
3.6	Príprava nekomerčného ELISA substrátu	80
3.7	Priebeh metódy ELISA	80
4	PRÍLOHY	82
4.1	Nastavenie nového protokolu na spektrofotometri	82

Návod slúži k stanoveniu Hsp70 v semenáčikoch hrachu.

1 SKRATKY

BSA	hovädzí sérový albumín
DMSO	dimetylsulfoxid
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidin dihydrochlorid

2 PRÍPRAVA VZORIEK

2.1 Chemikálie

Tab. 6: Chemikálie použité pri príprave vzoriek pre metódu ELISA.

Chemikálie	Dovozca
Hydrogenuhlíčitán sodný	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner, Česká republika
Uhlíčitán sodný	Lach-Ner, Česká republika

2.2 Príprava pufru použitého pri príprave vzoriek

Väzbový (coating) pufr

1. Navážime 1,272 g Na_2CO_3 a 1,512 g NaHCO_3 .
2. Navážky rozpustíme v 250 ml destilovanej vody a upravíme pH na hodnotu 9,6 (HCl).
3. Roztok doplníme do 300 ml.
4. Pripravený roztok autoklávuujeme a následne uchovávame pri teplote 4 °C, trvanlivosť pufru je 1-3 mesiace.

2.3 Postup prípravy vzoriek

1. Testovaný rastlinný materiál odvážeme, navážku preniesieme do tretej misky a pridáme 10-násobok väzbového pufru, (tzn. ak je navážka 0,18 g rastlinného materiálu, pridáme 1,8 ml väzbového pufru).
2. Rastlinný materiál s prídavkom väzbového pufru homogenizujeme pomocou tĺčika v tretej miske.
3. Po homogenizácii preniesieme homogenát do mikroskúmvky. Pre každú vzorku nová mikroskúmvka.
4. Vzorky centrifugujeme pri teplote 4 °C po dobu 10 minút pri otáčkach 16 000 x g.
5. Po centrifugácii prepipetujeme supernatanty do nových mikroskúmviek.
6. Pred samotným stanovením množstva Hsp70 pomocou metódy ELISA, si vzorky podľa potreby nariedime vo väzbovom pufri.
7. Po nariedení, vzorky nanášame na ELISA doštičku.

3 ELISA

3.1 Princíp metódy

Metóda ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) patrí medzi kvantitatívne analytické metódy ukazujúce reakciu antigénu s protilátkou prostredníctvom farebnej zmeny získanej použitím enzýmového konjugátu a enzýmového substrátu. ELISA má vysokú citlivosť a špecificitu a využíva sa k detekcii a stanoveniu koncentrácie antigénov (peptidy, proteíny, hormóny, vitamíny, liečivá) alebo protilátok. Princípom metódy je imunoenzýmová reakcia bezfarebného (chromogénneho) substrátu, ktorý je hydrolyzovaný na farebný produkt. Intenzita výsledného zafarbenia sa meria spektrofotometricky a je úmerná koncentrácii stanovovanej protilátky alebo antigénu.

3.2 Použité protilátky

Primárna protilátka – polyklonálna protilátka Hsp70 – Heat shock protein 70 (cytoplazmatická) protilátka produkovaná v zajacovi, (AS 08371) – Agrisera, Švédsko
Sekundárna protilátka – Anti-zajačia IgG (celá molekula) značená peroxidázou – protilátka produkovaná v koze, (A0545) – Sigma-Aldrich, USA

3.3 Použité prístroje a experimentálne vybavenie

96-jamková ELISA doštička Corning Costar – USA

Sada automatických pipiet – Eppendorf, Nemecko

Termostatovaná trepačka – BioSan, Lotyšsko

3.4 Chemikálie

Tab. 7: Chemikálie použité pri metóde ELISA.

Chemikálie	Dovozca
3, 3', 5, 5'-tetrametylbenzidín dihydrochlorid (TMB)	ROTH, Nemecko
Dihydrogenfosforečnan sodný hydrát	Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Česká republika
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Hovädzí sérový albumín (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný	Sigma-Aldrich, USA
Hydroxid sodný	Penta, Česká republika
Chlorid sodný	Penta, Česká republika
Kyselina citrónová	Lach-Ner, Česká republika
Kyselina sírová	Lach-Ner, Česká republika
Perborát sodný	Merck, Slovinsko
Tween 20	ROTH, Nemecko

3.5 Príprava roztokov

Premývací pufo 10x koncentrovaný

1. Navážime 43,82 g NaCl, 2,08 g NaH₂PO₄·H₂O a 0,74 g Na₂HPO₄.
2. Navážky rozpustíme v 400 ml destilovanej vody a upravíme pH na hodnotu 7,5 (NaOH).
3. Roztok doplníme do 500 ml, následne autoklavujeme a uchovávame pri teplote 4 °C.
4. Pred použitím je potrebné pufo nariediť, vid' nižšie.

Premývací pufo pre použitie

1. 50 ml 10x koncentrovaného premývacieho pufru zmiešame s 500 µl Tweenu 20 (pipetujeme pomocou odstihnutej špičky).
2. K zmesi pridáme 450 ml destilovanej vody.
3. Pracovný premývací pufo uchovávame pri teplote 4 °C.

3.6 Príprava nekomerčného ELISA substrátu

0,2 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnan sodný

1. Navážime 1,78 g Na₂HPO₄·2H₂O (alebo 3,58 g Na₂HPO₄·12H₂O alebo 1,42 g Na₂HPO₄).
2. Navážku rozpustíme v 50 ml destilovanej vody.
3. Roztok uchovávame pri teplote 4 °C.

0,1 mol·l⁻¹ kyselina citrónová

1. Navážku 1,92 g bezvodkej kyseliny citrónovej rozpustíme v 100 ml destilovanej vody.
2. Roztok uchovávame pri teplote 4 °C.

0,1 mol·l⁻¹ fosfo-citrátový pufo s perborátom sodným (4,89 mmol·l⁻¹) pH 4,6

1. 24 ml 0,2 mol·l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného zmiešame s 26 ml 0,1 mol·l⁻¹ kyseliny citrónovej.
2. Hodnotu pH roztoku upravíme na 4,6.
3. Následne k roztoku pridáme 0,0376 g perborátu sodného (tetrahydrát).
4. Roztok uchovávame pri teplote 4 °C v polyetylénovej nádobe. Trvanlivosť roztoku je 1 rok. **Roztok je nutné pripraviť minimálne deň dopredu!**

100 mmol·l⁻¹ TMB

1. Navážku 24 mg TMB rozpustíme v 1 ml DMSO.
2. Roztok uchovávame pri teplote 4 °C v tme. Roztok je použiteľný 1 rok.

Nekomerčný ELISA substrát pre použitie

1. 1 ml fosfo-citrátového pufru s perborátom sodným pH 4,6 zmiešame s 25 µl 100 mmol·l⁻¹ TMB (riedenie v pomere 1:40).
2. Roztok uchovávame v tme pri teplote 4 °C. **Roztok pripravíme aspoň 1 hodinu pred použitím, ale musíme ho použiť v rovnaký deň!**

3.7 Priebeh metódy ELISA

1. Do každej jamky ELISA doštičky pridáme 100 µl vzorky extrahovanej vo väzbovom pufri. Všetky vzorky pipetujeme v triplikáte. Pre každú vzorku pipetujeme aj vlastný blank (100 µl) v duplikáte. Blank pozostáva zo vzorky

- extrahovanej vo väzbovom pufri s nasledujúcim blokovaním, bez primárnej protilátky (namiesto primárnej protilátky pridáme 100 µl väzbového pufri), s prídavkom sekundárnej protilátky a následne ELISA substrátom.
2. Doštičku prikryjeme vičkom a obtiahneme parafilmom. Inkubujeme cez noc pri 4 °C (väzba antigenu na ELISA doštičku). **Od tohto kroku nesmú jamky nikdy vyschnúť!**
 3. Nasledujúci deň vytrepeme vzorky z jamiek, doštičku vysušíme poklepaním na servítku a premyjeme všetky jamky nasledujúcim postupom:
 - a. Do každej jamky pridáme 200 µl pracovného premývacieho pufu.
 - b. Každú jamku 7x premyjeme pomocou pipety (nasatím a vysatím objemu v pipete 7x za sebou).
 - c. Premývací pufor vytrepeme z jamiek.
 - d. Premývanie opakujeme ešte 2x, tzn. dokopy 3x premyjeme.
 - e. Na záver poriadne vytrepeme zvyšný pufor z jamiek.
 4. Do každej jamky pridáme 200 µl blokačného činidla, ktoré obsahuje 2% BSA s prídavkom 0,02% Tweenu 20 v pracovnom premývacom pufri.
 5. Doštičku prikryjeme vičkom, ktoré obtiahneme parafilmom a inkubujeme 2 hodiny pri 37 °C za trepania pri 300 rpm.
 6. Pred koncom inkubácie si pripravíme primárnu protilátku (vid'. bod 8).
 7. Po inkubácii vytrepeme vzorky z jamiek, doštičku vysušíme poklepaním na servítku a opäť premyjeme všetky jamky nasledujúcim postupom:
 - a. Do každej jamky pridáme 200 µl pracovného premývacieho pufu.
 - b. Každú jamku 7x premyjeme pomocou pipety (nasatím a vysatím objemu v pipete 7x za sebou).
 - c. Premývací pufor vytrepeme z jamiek.
 - d. Premývanie opakujeme ešte 2x, tzn. dokopy 3x premyjeme.
 - e. Na záver poriadne vytrepeme zvyšný pufor z jamiek.
 8. Do každej jamky pridáme 100 µl nariadenej primárnej protilátky. Primárnu protilátku riedime v pracovnom premývacom pufri v pomere 1:5000.
 9. Doštičku prikryjeme vičkom, ktoré obtiahneme parafilmom a inkubujeme 1 hodinu pri 37 °C za trepania pri 300 rpm.
 10. Pred koncom inkubácie vytiahneme z chladničky roztok 100 mmol·l⁻¹ TMB. **Roztok TMB musí byť pred riedením minimálne 1 hodinu pri laboratórnej teplote.** Pripravíme si sekundárnu protilátku (vid'. bod 12).
 11. Po inkubácii vytrepeme vzorky z jamiek, doštičku vysušíme poklepaním na servítku a opäť premyjeme všetky jamky nasledujúcim postupom:
 - a. Do každej jamky pridáme 200 µl pracovného premývacieho pufu.
 - b. Každú jamku 7x premyjeme pomocou pipety (nasatím a vysatím objemu v pipete 7x za sebou).
 - c. Premývací pufor vytrepeme z jamiek.
 - d. Premývanie opakujeme ešte 2x, tzn. dokopy 3x premyjeme.
 - e. Na záver poriadne vytrepeme zvyšný pufor z jamiek.
 12. Po premytí pridáme do každej jamky 100 µl sekundárnej protilátky (konjugovanej s chrenovou peroxidázou), ktorú riedime v pomere 1:3000 v pracovnom premývacom pufri a inkubujeme 1 hodinu pri 37 °C za trepania pri 300 rpm.
 13. Pripravíme si nekomerčný ELISA substrát pre použitie podľa kapitoly 3.6. **Substrát je potrebné pripraviť minimálne 1 hodinu pred použitím!**
 14. Po inkubácii vytrepeme vzorky z jamiek, doštičku vysušíme poklepaním na servítku a opäť premyjeme všetky jamky nasledujúcim postupom:
 - a. Do každej jamky pridáme 200 µl pracovného premývacieho pufu.

- b. Každú jamku 7x premyjeme pomocou pipety (nasatím a vysatím objemu v pipete 7x za sebou).
 - c. Premývací pufor vytrepeme z jamiek.
 - d. Premývanie opakujeme ešte 3x, tzn. dokopy 4x premyjeme.
 - e. Znovu do každej jamky pridáme 200 μl pracovného premývacieho pufru.
 - f. Premývací pufor ihneď vytrepeme z jamiek (už nenasávame pipetou).
 - g. Toto premytie opakujeme ešte raz (dokopy premyjeme 2x).
 - h. Na záver poriadne vytrepeme zvyšný premývací pufor z jamiek.
V jamkách nesmú zostať žiadne bublinky! Bublínky prepichnete špendlíkom.
15. Pridáme 100 μl nekomerčného ELISA substrátu pre použitie a inkubujeme 1 hodinu v tme pri 37 °C za trepania pri 300 rpm.
 16. Substrát aj doštičku **inkubujeme v tme, pretože substrát je na svetle nestály.**
 17. Po inkubácii zastavíme reakciu pridaním 50 μl 0,5 mol·l⁻¹ H₂SO₄ do každej jamky.
 18. Absorbanciu zmeriame na spektrofotometrickom readri pri vlnovej dĺžke 450 nm.

4 PRÍLOHY

4.1 Nastavenie nového protokolu na spektrofotometri

1. Spustíme spektrofotometrický reader (Synergy, H1) a k nemu príslušný počítač.
2. Zapneme program Gene 5, v záložke „Protocols“ stlačíme ikonu „Create New“.
3. Zvolíme štandardný typ protokolu.
4. V možnosti „Read“ nastavíme absorbanciu, Endpoint/Kinetics, monochromators a požadovanú vlnovú dĺžku, pri ktorej budeme merať absorbanciu.
5. Následne v záložke „Report/export Bulders“ nastavíme možnosť aby sa nám dáta vždy automaticky exportovali v novom Exceli.
6. Nastavený protokol uložíme pre ďalšie použitie.