



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodický postup aplikace metody SPR (rezonance povrchového plazmonu) pro detekci akumulace proteinů spojených se stresem suchem

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi



Autoři: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.,
Ing. Eva Jozová, Ph.D., Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.,
Mgr. Martina Vráblová, Ph.D.

České Budějovice, 2022

**Metodický postup aplikace metody SPR (rezonance povrchového plazmonu)
pro detekci akumulace proteinů spojených se stresem suchem**

Metodika byla vypracována jako výstup projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
Ing. Eva Jozová, PhD.
Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.
Mgr. Martina Vráblová, Ph.D.

Metodický postup aplikace metody SPR (rezonance povrchového plazmonu) pro detekci akumulace proteinů spojených se stresem suchem

Vladislav Čurn et al. 2022
curn@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a biotechnologií, FZT JU v Českých Budějovicích, České Budějovice
www.fzt.jcu.cz, <http://biocentrum.zf.jcu.cz>

Vypracováno za podpory projektu NAZV QK1810391 – Využití technik genomiky a transkriptomiky k tvorbě genových zdrojů a výchozích materiálů máku se specifickými vlastnostmi

Recenzenty metodiky byli:

Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.
VÚRV Praha - Ruzyně
Ing. Petr Zehnálek
ÚKZUZ, Hradec nad Svitavou

Text: ©2022 Čurn V. a kol.
Vydáno bez jazykové úpravy
ISBN: 978-80-7394-973-0

ISBN 978-80-7394-973-0



Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky.....	5
Vlastní popis metodiky	7
Úvod.....	7
Postup hodnocení stresových proteinů pomocí metody SPR	11
Příprava rostlinného materiálu	11
Extrakce bílkovin	12
Analýza rezonance povrchového plasmonu – detekce a kvantifikace stresových proteinů.....	13
Příklady výstupů a interpretace výsledů SPR analýzy....	15
Srovnání novosti postupů	21
Popis uplatnění metodiky	21
Ekonomické aspekty	22
Seznam použité literatury	23
Seznam publikací předcházející metodice.....	27

Uvedení problému a cíl metodiky

V důsledku klimatických změn je působení abiotického stresu na zemědělské plodiny stále více umocňováno. Některé oblasti jsou téměř každý rok postiženy škodlivým suchem (Nakashima et al. 2014). Proto se šlechtění na odolnost či toleranci k těmto nepříznivým faktorům prostředí stává aktuální i v našich klimatických podmínkách. Abiotické stresory obvykle vedou k dehydrataci buněk, která vede k poškození buněk a nakonec pletiv (Shinozaki et al. 2003). Proto si rostliny vyvinuly obranné mechanismy na ochranu proteinů a buněčných struktur proti tomuto poškození. Reakce rostliny zahrnuje změny na morfologické, fyziologické, biochemické a molekulární úrovni (Wang et al. 2003), což vede k omezení růstu, stárnutí, poklesu výnosu a dokonce k úhynu rostlin (Ye et al. 2017). Znalost obranných mechanismů je důležitá pro šlechtění nových odrůd odolných vůči suchu. Změny v rostlinných orgánech během abiotického stresu jsou spojeny s nahromaděním stresových proteinů, např. dehydrinů. Dehydriny jsou považovány za stresové proteiny podílející se na obraně rostliny proti dehydrataci (Agarwal et al. 2017; Bao et al. 2017; Drira et al. 2013; Liu et al. 2017; Yang et al. 2015; Zhou et al. 2017). Pravděpodobně interagují s povrchy membrán, jinými proteiny a nukleovou kyselinou, čímž zabraňují jejich denaturaci (Liu et al. 2017). Pro selekci genotypů máku setého s odlišnou strategií adaptace na suchu ve šlechtitelských programech máku setého je ale třeba najít vhodný nástroj, který by umožňoval relativně rychlý a levný, ale spolehlivý výběr rostlin/genetických zdrojů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem. Pro hodnocení tolerance rostlin ke stresu lze sice využít např. hodnocení fenotypové reakce (vadnutí) na nedostatek vody, ale tyto metody neposkytují hodnověrné výsledky. Řada studií se zabývá možností hodnocení reakce na stres na molekulární úrovni, na úrovni genu či proteinu. Pro analýzu reakce genů zapojených do odpovědi na stres je možné použít metodu RT-PCR a tedy hodnocení genové exprese příslušných genů. Dále je možné využít metod založených na identifikaci dehydrinů pomocí SDS-PAGE či Western blotu. Jako alternativa k těmto metodám je stále častěji využívána metoda SPR (surface plasmon resonance, rezonance povrchového plasmonu), moderní optická metoda pro studium nativních proteinů ve velmi nízkých koncentracích, a to i za přítomnosti jiných látek. Tato metoda umožňuje i kvantifikaci cílových proteinů specifickou vazbou protilátek. Používá plazmon na rozhraní dvou médií s dielektrickými konstantami opačných znaků – kovu a dielektrika (Šigutová et al. 2013).

Cílem metodiky je uvést přesný metodický návod hodnocení akumulace stresových proteinů pomocí metody rezonance povrchového plazmonu (SPR).

Vlastní popis metodiky

Úvod

Klíčovým faktorem, který zásadně ovlivňuje růst a vývoj rostlin a tím snižuje jejich životaschopnost je abiotický stres. Jedná se o sucho, zasolení, horko, chlad, mráz, dostupnost živin, intenzita světla, ozón a nedostatek kyslíku. U odrůd zemědělsky využívaných plodin brání plnému využití jejich genetického potenciálu, ať už přímo inhibicí metabolických procesů či nepřímo vyvolaným osmotickým, oxidativním a jiným stresem (Chinnusamy et al. 2007). Reakcí rostliny je řada morfologických, fyziologických, biochemických a molekulárních změn (Wang et al. 2003), které vzhledem k energetické a substrátové náročnosti mohou omezovat růst, zrychlovat senescenci, snižovat výnos a mohou způsobit i smrt (Ye et al. 2017). V současnosti je věnována pozornost předpovědím globálních klimatických změn, které by měly přinést zvýšení průměrné roční teploty a častější výkyvy počasí do extrémů (Suzuki et al. 2014). Téměř každý rok je některá část planety postižena ničivým suchem, které způsobuje ztrátu úrody (Nakashima et al. 2014). Dá se očekávat, že působení abiotického stresu na zemědělské plodiny bude dále umocňováno, a proto je aktuální šlechtění na odolnost k těmto nepříznivým faktorům prostředí a u řady plodin je šlechtění na suchovzdornost nejvýznamnějším šlechtitelským cílem. Pro úspěšné šlechtění nových, odolných odrůd je důležitá zejména znalost obranných mechanismů.

Jedním z těchto obranných mechanismů je aklimatizace, v jejímž průběhu dochází k indukci nebo naopak represi transkripce genů, které jsou spojeny s akumulací stresových proteinů (Örvar et al. 2000). Tyto geny můžeme dělit do dvou skupin. První skupina genů kóduje proteiny, které přímo chrání rostlinu před působením stresu, zatímco druhá skupina genů reguluje genovou expresi a přenosy signálů při reakci na stres. Řada z těchto genů kóduje signální molekuly – např. enzymy zapojené v metabolismu fosfolipidů, mitogenně aktivované proteinové kinázy (MAP kinázy), calcium-dependent proteinové kinázy (CDPK), receptorům podobné kinázy (RLK) a histidinové kinázy (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000).

V indukci genů zapojených v reakci na stres je zapojeno několik transkripčních regulačních systémů, které mohou nebo nemusí být řízeny kyselinou abscisovou (jedná se tedy o ABA-dependent, či ABA-independent transkripční regulační systémy) (Nakashima et al. 2014; Thomashow 1999).

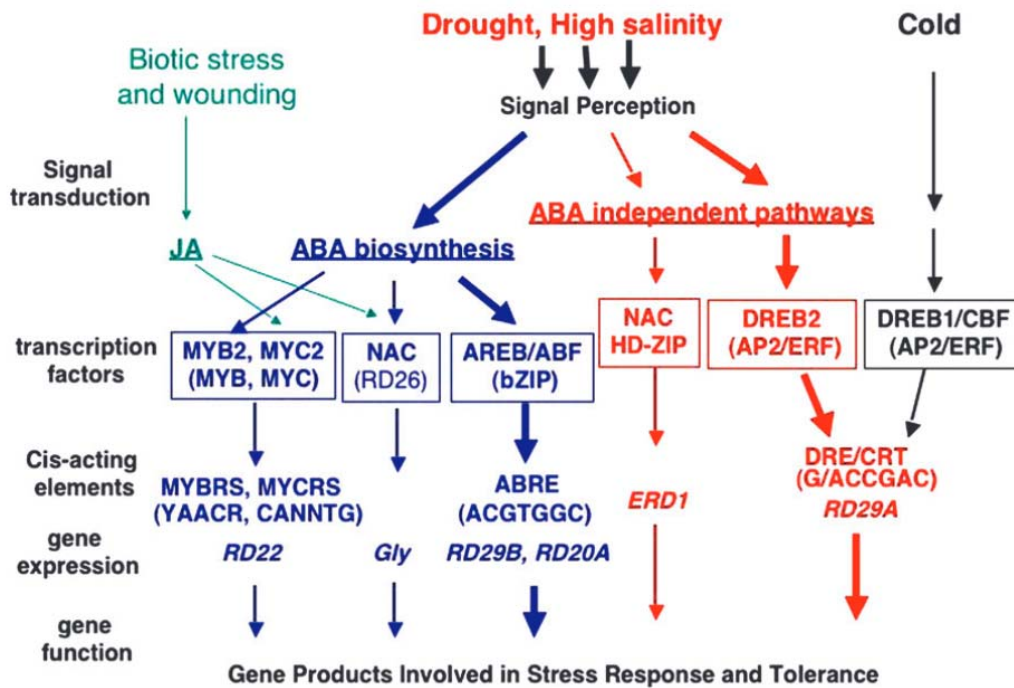
Podle Shinozaki et al. (2003) byla více než polovina genů indukovaných stresem suchem indukována zároveň i při stresu zasolením a aplikací kyseliny abscisové,

což napovídá, že signální dráhy reakcí na tyto typy stresů se prolínají. Naproti tomu, pouze 10 % genů indukovaných stresem suchem bylo indukováno také při stresu chladem. Mezi těmito geny bylo identifikováno mnoho transkripčních faktorů z proteinové rodiny DREB, vazebné faktory elementu zapojeného v reakci na etylén, rodina proteinů zinkových prstů, rodina WRKY proteinů, MYB proteinů, bHLH proteinů, bZIP proteinů a NAC proteinů. Tyto transkripční faktory společně či odděleně regulují reakce na různé stresy, čím vytváří funkční síť.

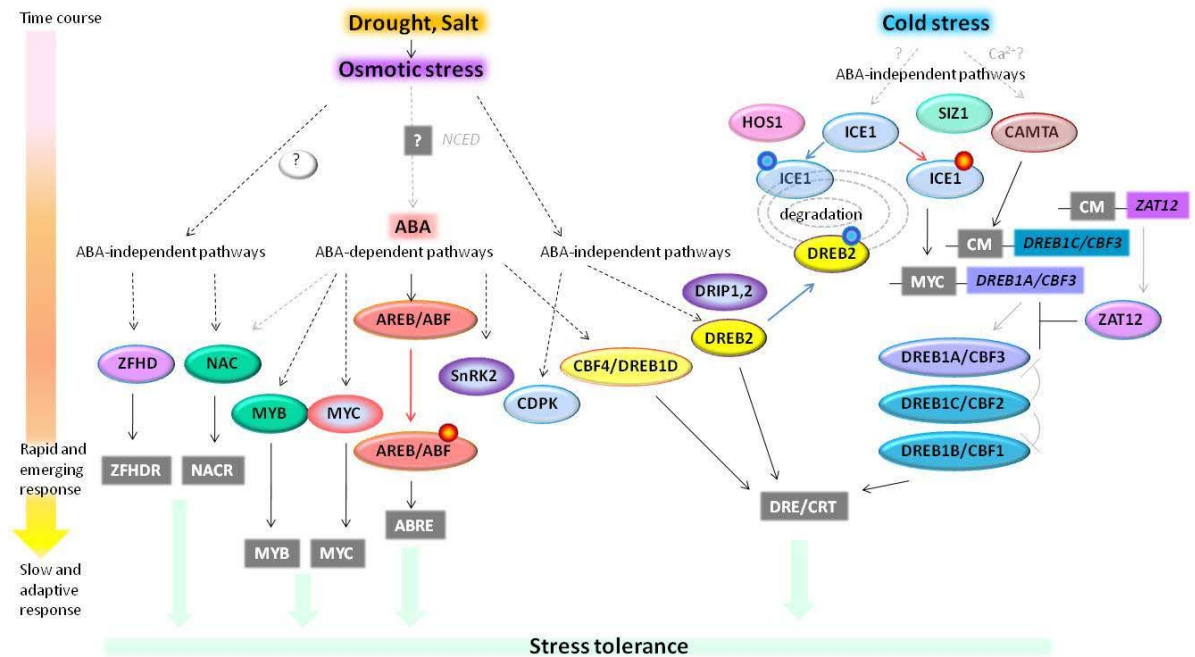
Mezi proteiny, které přímo chrání rostlinu před působením stresu byly identifikovány dehydriny (DHN), antifreeze proteiny (AFP), heat shock proteiny (HSP), proteiny obsahující cold-shock doménu (CSDP) a různé enzymy, např. alternativní oxidázy či desaturázy, případně enzymy generující/odbourávající volné kyslíkové radikály. Na obrázku č. 1 je znázorněna síť signálních drah zapojených v reakci na abiotický stres podle znalostí v roce 2007. Na obrázku č. 2 je znázorněna prakticky ta samá síť, ale je vytvořená v roce 2010. Během několika let se znalosti těchto signálních drah výrazně prohloubily.

Abiotický stres je v rostlinných orgánech spojen s akumulací ochranných proteinů, mezi proteiny, které přímo chrání rostlinu před působením stresu byly identifikovány mj. dehydriny (DHN) (Ingram and Bartels 1996). Tyto proteiny byly v minulosti identifikovány jako vhodné indikátory úrovně stresu (Klíma et al. 2012). Pravděpodobný mechanismus účinku je založen na funkci dehydrinů jako molekulárních chaperonů, které interagují s povrchem membrány, s jinými proteiny nebo nukleovými kyselinami a tím zabraňují jejich denaturaci (Graether and Boddington 2014; Hanin et al. 2011; Liu et al. 2017).

Ve vodném prostředí dehydriny zaujímají konformaci neuspořádaného řetězce, tvoří maximum vodíkových můstků s okolními molekulami vody a zároveň co nejméně intramolekulárních vodíkových můstků. Při nedostatku vody zaujímá K-segment α -helikální konformaci, dochází k přeskupení vodíkových můstků, k navázání dehydrinu na povrch částečně dehydratovaného proteinu a ten je tak chráněn před další ztrátou vody, která by vedla k jeho denaturaci (Ingram, Bartels, 1996). Podle Hughesové et. al. (2013) dehydriny s delšími řetězci aminokyselin chrání proteiny před denaturací účinněji. Některé dehydriny jsou schopny tvořit homo- i heterodimery, díky čemuž mohou dehydriny s kratšími řetězci zvyšovat svoji účinnost (Hernandez-Sanchez et al. 2017) a zároveň mohou být lépe chráněny před degradací, ke které jsou proteiny s neuspořádanými řetězci náchylné (Uversky and Dunker 2010).



Obr. 1: Signální dráhy aktivující geny zapojené v reakci na abiotický stres (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007).



Obr. 2: Signální dráhy aktivující geny zapojené v reakci na abiotický stres (Hirayama and Shinozaki 2010).

Hughesová a Graether (2011) naproti tomu tvrdí, že mechanismus účinku dehydrinů je založen na phi-segmentu, který pomáhá dehydrinu udržovat neuspořádanou strukturu a díky tomu může fungovat jako tzv. molekulární štít, který chrání okolní částečně denaturované proteiny před vzájemnou interakcí a K-segment slouží spíše k udržení dehydrinu na povrchu proteinu. Oba možné mechanismy účinku jsou pouze teoretické, přesný mechanismus není zatím znám.

Pro analýzu akumulace dehydrinů v klíčnicích rostlinách máku nejsou běžně využívané metody (SDS-PAGE, Western blot) vhodné kvůli velmi nízkému obsahu těchto proteinů v pletivech. Oproti tomu metoda SPR, resp. SPRi umožňuje studium nativních proteinů i ve velmi nízkých koncentracích. Překážkou není ani přítomnost dalších látek, takže jako vzorek pro analýzu postačí hrubý extrakt z rostlinného pletiva (Douzi 2017).

Metoda (SPR) se řadí mezi jednu z nejrozvinutějších optických detekčních technik. Tato metoda se nejčastěji využívá v oblasti biosenzorů. Jedná se o citlivé optické biosenzory, které jsou schopné detekovat biomolekuly i ve velmi nízkých koncentracích. Metoda využívá plazmon vznikající na rozhraní kovu a dielektrika k detekci interakcí molekul umístěných na povrchu kovu – biočipu. Jestliže je na povrch senzoru navázána biomolekula, dojde ke změně indexu lomu tohoto prostředí a měřením změny úhlu, při němž dochází ke vzniku SPR, lze tuto látku detekovat. Při měření kinetiky sledované interakce dvou biomolekul lze vyhodnotit množství stanovované látky ve směsi (Šigutová et al. 2013; Lesňák et al. 2013). Nařaděná protilátka je nanosena (naspotována) na povrch biočipu a jeho odezva je sledována vždy současně na bodech obsahujících protilátku a na referenčních bodech (povrch biočipu, kde nebyla naspotována protilátka (Hoštičková et al. 2021).

Postup hodnocení stresových proteinů pomocí metody SPR

Příprava rostlinného materiálu

Analýzy probíhají v klíčnicích rostlinách pěstovaných za standardních podmínek a za podmínek stresových – při simulovaném nedostatku vody. Nedostatek vody je simulován pomocí polyethylenglykolu, kdy je možno přesně definovat počátek stresu a jeho úroveň. PEG 6000 je smíchán s destilovanou vodou, aby se vytvořil osmotický potenciál -0,4 MPa a -0,6 MPa (Toosi et al. 2014). Příprava roztoku PEG je prováděna podle publikace Michela a Kaufmanna (1973). Klíčení semen a raný růst sazenic je prováděno na Petriho miskách s filtračním papírem. Sterilní filtrační papír je namočen do roztoku autoklávované destilované vody a polyethylenglykolu 6000 (PEG 6000) a umístěn do sterilní Petriho misky. V kontrolní misce je filtrační papír namočen pouze do autoklávované destilované vody. Semena máku jsou sterilizována v 8% roztoku chloraminu T po dobu 30 minut a omývána destilovanou vodou. Na misku je umístěno 30 semen na filtrační papír. Pěstování je prováděno v pěstební komoře při konstantní teplotě 22 °C a 16hodinové fotoperiodě. Po deseti dnech jsou klíčící rostliny navzorkovány do zkumavek a okamžitě zmrazeny tekutým dusíkem. Před dalším zpracováním jsou vzorky uloženy v hlubokomrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Použité přístroje a pomůcky:

- chladicí box a termoska na kapalný dusík
- hlubokomrazicí box -80°C
- autokláv
- magnetická míchačka
- analytické váhy
- filtrační papír nebo papír typu Whatman 3MM
- 90mm Petriho misky
- pinzeta
- kultivační box/fytotron

Chemikálie:

- kapalný dusík
- polyethylenglykol 6000
- destilovaná voda
- chloramin T

Extrakce bílkovin

Extrakce probíhá z děložních listů klíčnicích rostlin, které jsou homogenizovány pomocí kapalného dusíku v třecí misce. 250 mg vzorku je poté smícháno s 1 ml extrakčního pufru (20mM Tris-HCl, pH=7,5 + 0,5M NaCl), vortexováno a poté centrifugováno při 14 000 x g při 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant je odebrán do nové zkumavky a umístěn do tepelného bloku předehřátého na 100 °C po dobu 15 minut. Poté jsou vzorky ihned umístěny na 10 min do ledu, odstředěny po dobu 20 minut a supernatant je odebrán do nové zkumavky a až do analýzy skladován při -20 °C (Castaneda- Saucedo et al. 2014).

Použité přístroje a pomůcky:

- chladicí box a termoska na kapalný dusík
- hlubokomrazicí box -80 °C
- porcelánová třecí miska
- centrifuga s možností chlazení
- sada automatických pipet
- vortex
- třepací termoblok
- analytické váhy
- magnetická míchačka
- pH metr
- mrazák -20 °C
- výrobce ledu
- mikrocentrifugační zkumavky

Chemikálie:

- kapalný dusík
- extrakční pufr (20mM Tris-HCl, pH=7,5, 0,5M NaCl)
- destilovaná voda

Analýza rezonance povrchového plasmonu – detekce a kvantifikace stresových proteinů

Před vlastním měřením jsou vzorky ředěny v poměru 1:200 v 10mM PBS pufru (pH=7,4), který je využit také jako nosný pufr. Pro vlastní SPRi analýzu je použit komerčně dodávaný biočip CS-LD (Horiba Scientific, France), který obsahuje chemickou vrstvu obsahující funkční skupiny vhodné pro navázání protilátky. Protilátka anti-Dehydrin (Agrisera, Sweden) je naředěna 10mM PBS puftrem (pH 7,4) v koncentraci 1:10 000 a je naspotována na biočip, který je následně vyblokován etanolaminem a saturován 1% BSA.

Po této proceduře je biočip s imobilizovanou protilátkou vložen do systému OpenPlex SPRi (Horiba Scientific, France), zaplaven 20mM Tris-HCl puftrem pH 7,5 (pracovní pufr) a je vytvořen plasmon. Měření SPRi je prováděno v pevném úhlu a vlnové délce. Je proměřováno pět spotů s protilátkou a pět spotů referenčních (povrch biočipu bez protilátky).

Vzorky jsou před kontaktem s povrchem biočipu padesátkrát zředěny pracovním puftrem. Průtok je nastaven na 50 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Reflexivita (%) získaná na referenčních místech je odečtena od signálu zjištěného na protilátce pro každý vzorek.

Po změření odezvy každého vzorku je biočip regenerován 1% SDS a znovu saturován 1% BSA.

Použité přístroje a pomůcky:

- přístroj pro SPR analýzu - např. OpenPlex SPRi (Horiba Scientific, France)
- sada automatických pipet
- vortex
- analytické váhy
- magnetická míchačka
- pH metr
- mrazák -20 °C
- mikrocentrifugační zkumavky
- biočip – např. CS-LD (Horiba Scientific, France)

Chemikálie:

- nosný pufr = 10mM PBS pufr pH=7,4
- pracovní pufr = 20mM Tris-HCl pufr pH 7,5
- specifická protilátka - anti-Dehydrin (Agrisera, Sweden)
- etanolamin
- 1% BSA
- 1% SDS

Příklady výstupů a interpretace výsledů SPR analýzy

Metoda analýzy povrchového plazmonu, resp. metoda povrchového plazmového rezonančního zobrazování (SPRi) byla testována jako potenciálně vhodný nástroj pro selekci genotypů máku s odlišnou strategií adaptace na suchu. Na základě předchozích výsledků (Hoštičková et al. 2018) bylo vybráno šest odrůd máku s odlišným fenotypovým projevem: 'Ferrara', 'Florian', 'Opava-Komarov', 'R2', 'Papaver41' a 'Malsar'.

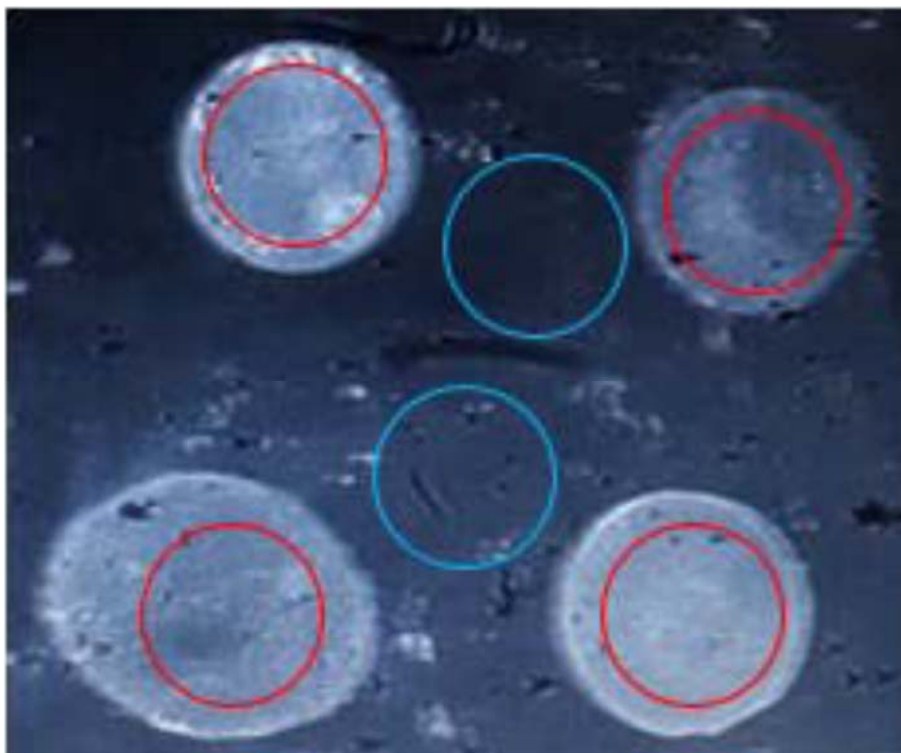
Semena byla vyklíčena v Petriho miskách a byla analyzována akumulace dehydrinu v klíčcích rostlin kontrolních a rostlinách kultivovaných v podmínkách simulovaného nedostatku vody. Na obrázku 3 je ukázka vývoje klíčcích rostlin v podmínkách simulovaného stresu při osmotickém potenciálu roztoku PEG 6000 -0,4 MPa.



Obrázek 3: Ukázka vývoje klíčcích rostlin a odlišné reakce na dostupnost vody při klíčení v podmínkách simulovaného stresu.

Kultivace rostlin, příprava vzorků a extrakce dehydrinů je popsána v kapitole „Postup hodnocení stresových proteinů pomocí metody SPR“. Dehydriny nejsou purifikovány, analyzován je „hrubý“ extrakt bílkovin.

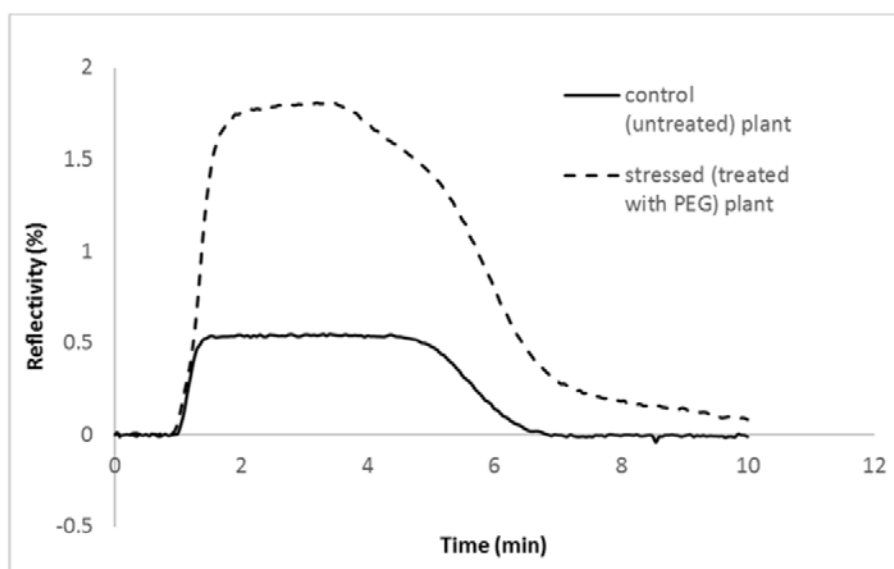
Při vlastní analýze je nutné detekovat reakci biosenzoru na protilátkových a referenčních (negativní kontrola) místech z důvodu možných interferencí látek obsažených ve vzorku (Obrázek 4).



Obrázek 4: Příklad skvrn protilátky na povrchu biočipu. Měřicí plochy jsou znázorněny barevnými kruhy (červené pro protilátku, modré pro referenci).

Ukázka výstupu – SPR signálu a jeho interpretace:

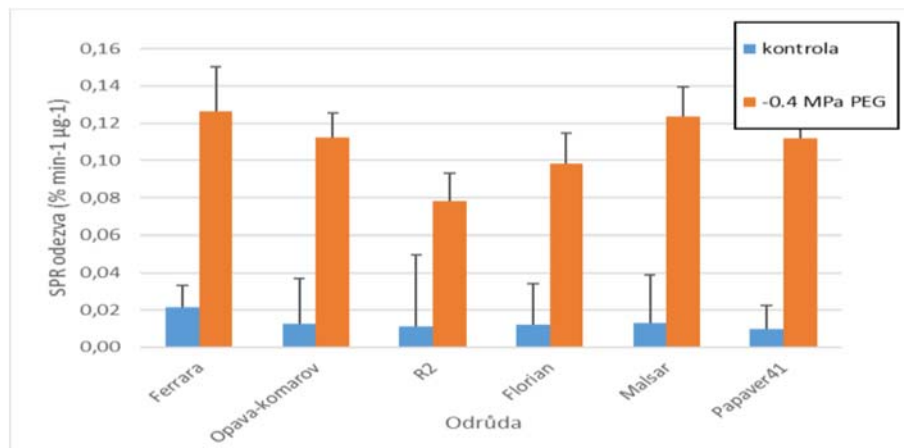
Výsledky ukazují zvyšující se SPR signál u rostlin ošetřených PEG. Křivky znázorňující SPR signál vzorků získaných z klíčnicích rostlin kultivovaných v roztoku PEG detekovaný na spotech s protilátkou se lišily intenzitou i tvarem v porovnání s kontrolními rostlinami. Vrcholy SPR signálu u rostlin ošetřených PEG, detekované na skvrnách s protilátkou, se lišily intenzitou a tvarem ve srovnání s kontrolami (neošetřené rostliny) (Obrázek 5). Výška vrcholu je způsobena přítomností proteinů ve vzorku. Afinita dehydrinů k protilátce je viditelná v první části vrcholu (asociační fáze), dokud není dosaženo maxima. Disociační fáze (pokles signálu způsobený klesající koncentrací měřených proteinů v důsledku eluce vzorku z měřicí buňky pracovním pufrém) je ve stresovaných rostlinách ve srovnání s kontrolami relativně pomalá.



Obrázek 5: Příklad signálu SPR získaného imunodetekcí dehydrinů v extraktu bílkovin z listů máku (kontrolní a stresované rostliny).

Ukázka výstupu – kvantifikace dehydrinů u pilotního experimentu (kontrola a stres -0,4 MPa PEG):

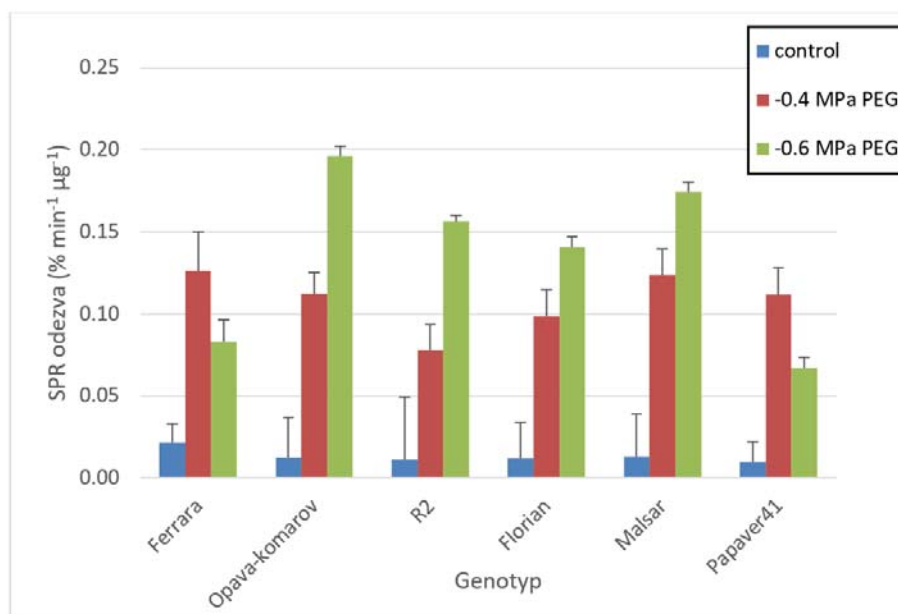
Akumulace dehydrinů byla několikanásobně vyšší u variant s PEG v roztoku než u kontrolních variant. Největší rozdíl byl pozorován u genotypu Papaver 41, kde byla akumulace dehydrinů v rostlinách klíčících v roztoku PEG více než 11x vyšší než v rostlinách kontrolních. Výrazné zvýšení akumulace dehydrinů u rostlin klíčících v roztoku PEG v porovnání s kontrolními rostlinami bylo pozorováno také u genotypu Malsar (více než 9 násobné zvýšení) či Ostrava-Komarov (9 násobné zvýšení). Nejmenší rozdíl mezi rostlinami kontrolními a klíčícími v roztoku PEG byl pozorován u genotypu Ferrara, kde byl naměřen nezanedbatelný téměř 6 násobný nárůst akumulace dehydrinů u rostlin v roztoku PEG (Obrázek 6). Pro ověření interakce dehydrinů s povrchem biočipu byl použit purifikovaný dehydrin.



Obrázek 6: Normalizované odezvy SPR – relativní akumulace dehydrinů v rostlinách klíčených v kontrolních podmínkách (modré sloupce) a v podmínkách simulovaného sucha (oranžové sloupce).

Ukázka výstupu – kvantifikace dehydrinů u stresového experimentu (kontrola a stres -0,4 MPa PEG a -0,6 MPa PEG):

Změny akumulace dehydrinů mezi kontrolami a stresovanými rostlinami a mezi odrůdami jsou znázorněny na obrázku 7. Nejvyšší relativní akumulace dehydrinů v kontrolních rostlinách byla zjištěna u odrůdy „Ferrara“ (téměř dvakrát vyšší než u kontrolních rostlin jiných odrůd). Nejnížší relativní akumulace dehydrinů byla u odrůdy „Papaver 41“. Tato odrůda také vykazovala nejnížší relativní akumulaci dehydrinů v rostlinách pod osmotickým stresem -0,6 MPa. Nejvyšší nárůst akumulace byl zaznamenán u odrůdy „Opava-Komarov“. Za osmotického stresu -0,6 MPa se relativní akumulace dehydrinů zvýšila téměř 16krát ve srovnání s kontrolními rostlinami této odrůdy.



Obrázek 7: Relativní akumulace dehydrinů u odrůd máku – u rostlin kultivovaných v kontrolních podmínkách (modré sloupce), v podmínkách simulovaného sucha -0,4 MPa (červené sloupce) a v podmínkách simulovaného sucha -0,6 MPa (zelené sloupce).

Obecně lze odrůdy rozdělit do dvou skupin podle akumulace dehydrinů. První skupina, která zahrnuje odrůdy 'Ferrara' a 'Papaver 41' vykazovala pokles akumulace dehydrinů při intenzivnějším stresu ze sucha. Druhá skupina, která zahrnuje ostatní odrůdy, vykazovala trvalý nárůst akumulace dehydrinů za zvyšujících se stresových podmínek.

Důležitá role těchto dehydrinů v rostlinách v průběhu reakce na abiotický stres byla v minulosti prokázána například u růží (Haimi et al. 2017; Ouyang et al. 2019), bříz (Tatarinova et al. 2018), ječmene a pšenice (Kosová et al. 2011), paprik (Chen et al. 2015) či řepky (Jelínková et al. 2014, 2016; Urban et al. 2013).

Běžně používané metody detekce těchto proteinů u stresovaných rostlin jsou SDS-PAGE či western blot (např. Hellal et al. 2018; Parmentier-Line et al. 2002). V porovnání s těmito metodami je však metoda SPRi levnější, rychlejší a citlivější. Právě její vyšší citlivost je nespornou výhodou, neboť u některých plodin je akumulace těchto proteinů tak nízká, že je pomocí konvenčních metod obtížně detekovatelná.

Výsledky uvedené v příkladech výstupů analýz ukazují rostoucí SPR signál v PEG ošetřených rostlinách. Podle našich výsledků navrhuje metodu SPRi jako vhodný nástroj pro selekci genotypů máku s odlišnou strategií adaptace na sucho.

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodický postup aplikace metody SPR (rezonance povrchového plazmonu) pro detekci akumulace proteinů spojených se stresem suchem“ lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není šlechtitelské praxi k dispozici ucelená metodika pro hodnocení kvantifikace dehydrinů/stresových proteinů pomocí metody rezonance povrchového plazmonu. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích. Navíc se tyto informace týkají jiných plodin, než je mák, *Papaver somniferum*. Komplexní metodický postup tedy k dispozici není.

Metoda SPR (surface plasmon resonance, rezonance povrchového plasmonu) je moderní optická metoda pro studium nativních proteinů ve velmi nízkých koncentracích, a to i za přítomnosti jiných látek, a je dobře využitelná jako výhodná alternativa doposud používaným metodám typu SDS-PAGE či Western blotu. Potenciál využití metody SPR lze spatřovat v rychlosti a citlivosti analýzy, která navíc nevyžaduje purifikaci dehydrinů a vlastní analýza je finančně nenáročná. Limity pak představuje požadavek na specifické přístrojové vybavení a dostupnost protilátky. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy od kultivace rostlin, odběru vzorku, izolaci bílkovin po vlastní SPR analýzu tak, aby bylo dosaženo optimálního výsledku.

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro detekci a kvantifikaci stresových proteinů, např. dehydrinů je možné ve šlechtitelských laboratořích či v laboratořích, které se zabývají molekulárně-biologickými analýzami a detekcí proteinů. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru materiálu, izolaci bílkovin po vlastní provedení SPR analýzy a vyhodnocení změn v akumulaci cílových proteinů.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována pro přesnou a spolehlivou detekci stresových proteinů a výběr rostlin s adekvátní reakcí na stres. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách klimatické změny a nedostatku vody. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu např. šlechtitelských laboratoří.

Uživatelé metodiky jsou výzkumná pracoviště, laboratoře šlechtitelských firem, které mohou dle svých laboratorních možností využít analýzy rezonance povrchového plazmonu pro rozšíření portfolia svých postupů a služeb. Metodika bude uplatněna prostřednictvím biotechnologické firmy OSEVA PRO s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Analýzy popisované v této metodice mají značný ekonomický význam z pohledu šlechtitelských pracovišť. V důsledku rychle postupující klimatické změny se šlechtění na odolnost či toleranci k abiotickému stresu suchem stává vysoce aktuální a celosvětově nejvýznamnějším šlechtitelským cílem. Ve šlechtitelských programech máku setého je nutné pro selekci genotypů máku s odlišnou strategií adaptace na sucho třeba najít vhodný nástroj, který by umožňoval relativně rychlý a levný, ale spolehlivý výběr rostlin/genetických zdrojů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem.

Metoda SPR (surface plasmon resonance, rezonance povrchového plasmonu) jako moderní optická metoda pro studium nativních proteinů ve velmi nízkých koncentracích, a to i za přítomnosti jiných látek, je vhodnou volbou pro skríníng šlechtitelských populací a výběr cílových genotypů.

Pomocí navrženého metodického postupu lze objektivně vyhodnotit akumulaci stresových proteinů a selektovat genotypy máku s odlišnou strategií adaptace na sucho. Právě možnost cíleného výběru šlechtitelských materiálů s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem je naprosto klíčová pro úspěšné šlechtění rostlin, které budou poskytovat optimální výnos a kvalitu i podmínkách klimatické změny.

Pro provedení analýz je potřebné disponovat vybavenou molekulárně-biologickou laboratoří, kde klíčovým přístrojovým vybavením je přístroj pro provedení SPR analýzy. Náklady na analýzu pak představují pořízení čipu a protilátky vůči detekovanému proteinu. Ostatní náklady na pufrý jsou na velmi nízké úrovni. Typová cena analýzy je pak na úrovni 1000 Kč. K této ceně je nutné započítat náklady na pořízení přístrojového vybavení, odpisy a energie. Pro molekulárně biologickou laboratoř uvedený metodický postup může znamenat zajímavé rozšíření portfolia nabízených služeb a ekonomický přínos v podobě zisku z prováděných analýz. V širším kontextu pak zcela zásadním přínosem pro šlechtitelské pracoviště je novošlechtění/odrůda s vyšší tolerancí k abiotickému stresu suchem.

Seznam použité literatury

- Agarwal, T., Upadhyaya, G., Halder, T., Mukherjee, A., Majumder, A.L., and Ray, S. (2017): Different dehydrins perform separate functions in *Physcomitrella patens*. *Planta*, 245, 101–118.
- Bao, F., Du, D., An, Y., Yang, W., Wang, J., Cheng, T., and Zhang, Q. (2017): Overexpression of *Prunus mume* Dehydrin Genes in Tobacco Enhances Tolerance to Cold and Drought. *Front. Plant Sci.*, 8, 151.
- Castaneda-Saucedo, C.M., Cordova-Tellez, L., Tapia-Campos, E., Delgado-Alvarado, A., Gonzalez-Hernandez, V.A., Santacruz-Varela, A., Loza-Tavere, H., Garcia-de-Los-Santos, G., and Vargas-Suarez, M. (2014): Dehydrins Patterns in Common Bean Exposed to Drought and Watered Conditions. *Rev. Fitotec. Mex.*, 37, 59–68.
- Douzi B. (2017): Protein-Protein Interactions: Surface Plasmon Resonance. *Methods Mol Biol.* 1615, 257-275.
- Drira, M., Saibi, W., Brini, F., Gargouri, A., Masmoudi, K., and Hanin, M. (2013): The K-Segments of the Wheat Dehydrin DHN-5 are Essential for the Protection of Lactate Dehydrogenase and beta-Glucosidase Activities In Vitro. *Mol. Biotechnol.* 54, 643–650.
- Graether, S.P., and Boddington, K.F. (2014): Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.* 5.
- Haimi, P., Vinskienė, J., Stepulaitienė, I., Baniulis, D., Stanienė, G., Šikšnianienė, J.B., and Rugienius, R. (2017): Patterns of low temperature induced accumulation of dehydrins in Rosaceae crops—Evidence for post-translational modification in apple. *Journal of Plant Physiology*, 218, 175–181.
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., and Masmoudi, K. (2011): Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signal Behav* 6, 1503–1509.
- Hellal, F.A., El-Shabrawi, H.M., Abd El-Hady, M., Khatab, I.A., El-Sayed, S.A.A., and Abdelly, C. (2018): Influence of PEG induced drought stress on molecular and biochemical constituents and seedling growth of Egyptian barley cultivars. *J Genet Eng Biotechnol*, 16, 203–212.
- Hernández-Sánchez, I.E., Maruri-López, I., Graether, S.P., and Jiménez-Bremont, J.F. (2017): In vivo evidence for homo- and heterodimeric interactions of *Arabidopsis thaliana* dehydrins AtCOR47, AtERD10, and AtRAB18. *Scientific Reports* 7, 17036.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2010): Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61, 1041–1052.

- Hoštičková, I., Vráblová, M., Rychlá, A., Hronková, M., Jozová, E., and Čurn, V. (2018): Infračervená termografie jako nástroj pro výběr genotypů máku s kontrastní reakcí na stres suchem. 66, Úroda - vědecká příloha, 12, 143–146.
- Hoštičková I., Vráblová M., Hejna O., Čurn V. (2021): Využití metody SPRi pro studium reakce rostlin máku na stres suchem. 69, Úroda – vědecká příloha, 12, 145-148.
- Hughes, Stephanie and Graether, Steffen (2011): Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 20. 42-50.
- Hughes, S.L., Schart, V., Malcolmson, J., Hogarth, K.A., Martynowicz, D.M., Tralman-Baker, E., Patel, S.N., and Graether, S.P. (2013): The Importance of Size and Disorder in the Cryoprotective Effects of Dehydrins. *Plant Physiol*. 163, 1376–1386.
- Chen, R., Jing, H., Guo, W., Wang, S.-B., Ma, F., Pan, B.-G., and Gong, Z.-H. (2015): Silencing of dehydrin CaDHN1 diminishes tolerance to multiple abiotic stresses in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Rep* 34, 2189–2200.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007): Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*. 12, 444–451.
- Ingram, J., and Bartels, D. (1996) The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377–403.
- Jelínková, I., Chickaputaiah, C., Havlíčková, L., Vítámvás, P., and Urban, M.O. (2014): Komparativní analýza exprese na úrovni genů/proteinů indukovaných v podmínkách stresu suchem u řepky olejky. *Úroda, vědecká příloha*, 12, 167-170.
- Jelínková, I., Chickaputaiah, C., Čurn, V., Urban, M.O., and Klíma, M. (2016): Analýza exprese genů indukovaných stresem chladem u řepky. *Úroda, vědecká příloha*, 12, 149–152.
- Klíma, M., Vítámvás, P., Zelenková, S., Vyvadilová, M., and Prášil, I.T. (2012): Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances. *Biol Plant*, 56, 157–161.
- Kosová, K., Vítámvás, P., and Prášil, I.T. (2011): Expression of dehydrins in wheat and barley under different temperatures. *Plant Science*, 180, 46–52.
- Lesňák M., Staněk F., Pištora J., Staňková M. (2013): Sledování vlivu koncentrace alkoholů na odezvu měřenou metodou plasmonové rezonance. *Chem. Listy* 107, 491–495.
- Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., and Li, D. (2017): Multifunctional Roles of Plant Dehydrins in Response to Environmental Stresses. *Front. Plant Sci.*, 8, 1018.
- Michel, B.E., and Kaufmann, M.R. (1973): The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51, 914–916.

- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2014): The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front. Plant Sci.*, 5, 170.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S. (2000): Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J.* 23, 785–794.
- Ouyang, L., Leus, L., De Keyser, E., and Van Labeke, M.-C. (2019): Seasonal changes in cold hardiness and carbohydrate metabolism in four garden rose cultivars. *J. Plant Physiol.* 232, 188–199.
- Parmentier-Line, C.M., Panta, G.R., and Rowland, L.J. (2002): Changes in dehydrin expression associated with cold, ABA and PEG treatments in blueberry cell cultures. *Plant Science*, 162, 273–282.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 410–417.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217–223.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E., and Mittler, R. (2014): Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203, 32–43.
- Šigutová R., Lesňák M., Kušnierová P., Švagera Z., Šafarčík K., Využití metody Surface Plasmon Resonance imaging (SPRI) v praxi, FONS Informační bulletin. 2013.
- Tatarinova, T.D., Vetchinnikova, L.V., Bubyakina, V.V., Perk, A.A., Ponomarev, A.G., Vasilieva, I.V., Serebryakova, O.S., and Petrova, N.E. (2018): Dehydrins in Buds of Main Birch Species under Conditions of Karelia. *Russ J Plant Physiol*, 65, 295–301.
- Thomashow, M.F. (1999): Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571–599.
- Toosi, Abbas & Bakar, Baki & Azizi, Mehdi. (2014): Effect of drought stress by using peg 6000 on germination and early seedling growth of Brassica juncea Var. Ensabi. *Scientific Papers. Series A. Agronomy.* LVII. 360-363.
- Urban, M.O., Klima, M., Vitamvas, P., Vasek, J., Hilgert-Delgado, A.A., and Kucera, V. (2013): Significant relationships among frost tolerance and net photosynthetic rate, water use efficiency and dehydrin accumulation in cold-treated winter oilseed rapes. *Journal of Plant Physiology*, 170, 1600–1608.
- Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2010): Understanding protein non-folding. *BBA-Proteins Proteomics* 1804, 1231–1264.

- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14.
- Yang, W., Zhang, L., Lv, H., Li, H., Zhang, Y., Xu, Y., and Yu, J. (2015): The K-segments of wheat dehydrin WZY2 are essential for its protective functions under temperature stress. *Front. Plant Sci.*, 6, 406.
- Ye, Y., Ding, Y., Jiang, Q., Wang, F., Sun, J., and Zhu, C. (2017): The role of receptorlike protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. *Plant Cell Reports*, 36, 235–242.
- Zhou, Y., He, P., Xu, Y., Liu, Q., Yang, Y., and Liu, S. (2017): Overexpression of CsLEA11, a Y3SK2-type dehydrin gene from cucumber (*Cucumis sativus*), enhances tolerance to heat and cold in *Escherichia coli*. *AMB Express*, 7, 182.

Seznam publikací předcházející metodice

Hoštičková I., Vráblová M., Hejna O., Čurn V. (2021): Využití metody SPRi pro studium reakce rostlin máku na stres suchem. *Úroda* 12, roč. LXIX, vědecká příloha, s. 145-148. ISSN 0139-6013.

Kundrátová, K.; Bartas, M.; Pečinka, P.; Hejna, O.; Rychlá, A.; Čurn, V.; Červeň, J. (2021): Transcriptomic and Proteomic Analysis of Drought Stress Response in Opium Poppy Plants during the First Week of Germination. *Plants* 10, 1878.

Hoštičková I., Vráblová M., Rychlá A., Hronková M., Jozová E., Čurn V. (2018): Infračervená termografie jako nástroj pro výběr genotypů máku s kontrastní reakcí na stres suchem. *Úroda* 12, roč. LXVI, 2018, vědecká příloha, ISSN 0139-6013, s. 143-146.

Jelínková I., Vráblová M., Harenčák J., Štoidl P., Čurn V. (2017): Využití metody rezonance povrchového plazmonu k selekci chladu odolných genotypů řepky ozimé (*Brassica napus* subsp. *napus*). *Úroda* 12, roč. LXV, vědecká příloha, s. 215-217, ISSN 0139-6013.

Název: Čurn V. a kol. (2022): Metodický postup aplikace metody SPR (rezonance povrchového plazmonu) pro detekci akumulace proteinů spojených se stresem suchem

Autorský kolektiv: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Ing. Irena Hoštičková, Ph.D.
Ing. Eva Jozová, Ph.D.
Mgr. et Ing. Ondřej Hejna, Ph.D.
Mgr. Martina Vráblová, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská a technologická
Studentská 1668
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika je dostupná na:
http://biocentrum.zf.jcu.cz/docs/lab/Metodiky-mak_spr-7137b2083f.pdf

Osvědčení o certifikaci UKZUZ 006947/2023.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 31.1.2023 (č.j. MZE-4478/2023-13132), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v zemědělské praxi.

Kontakt na autory: curn@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7394-973-0

ISBN 978-80-7394-973-0

