

FLUORIMETRIC SINGLE CELL ANALYSIS OF PLANT ESTERASES OF TOBACCO AND NORWAY SPRUCE

FLUORIMETRICKÁ DETEKCE ESTERÁS JAKO NÁSTROJ PRO ROZPOZNÁNÍ JEDNOTLIVÝCH BUNĚK TABÁKU A SMRKU

Baloun J.¹⁾, Víteček J.¹⁾, Petřek J.¹⁾, Petrlová J.²⁾, Havel L.¹⁾, Mikelová R.^{2,3)}, Adam V.^{2,4)}, Kizek R.²⁾

¹⁾Department of Plant Biology and ²⁾Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³⁾Department of Theoretical and Physical Chemistry, and ⁴⁾Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: 777.7@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Nowadays, studies of metabolic pathways and processes in living organisms cannot be easily done at the cellular level. That is why the development of a new analytical methods and approaches is needed, to allow detection of different biologically important species at very low concentrations levels and sample volumes, especially in individual cells. In the present work, we optimised the analysis of plant esterases based on fluorimetric detection of the products of the enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate. The detection limits was 17 amol in 2 ml (8.5 fM). We assumed that the optimised method for the determination of PE in cell extracts accomplishes all requirements for a sensitive analysis which could be usable for single cell analysis. Therefore we used this technique for analysis of plant cell cultures (BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of Norway spruce, clone 2/32) The detection limit was 1.5 in case of analysing BY-2 tobacco cells and 0.5 in early somatic embryos. Finally we used the optimised technique to study of the individual BY-2 protoplasts.

Keywords: Esterases, Fluorescein diacetate, Fluorimetry, Tobacco BY-2 cells, Early somatic embryos of Norway spruce (clone 2/32), Protoplasts.

ABSTRAKT

Metabolické dráhy a procesy probíhající v živých organismech je velmi složité studovat přímo na buněčné úrovni. A proto je nezbytné vyvíjet nové analytické metody a postupy, které by umožnily detekovat různé biologicky důležité látky ve velmi nízkých koncentracích a objemech, zejména v jednotlivých buňkách. V této práci jsme optimalizovali metodu pro analýzu rostlinných esterás založenou na fluorimetrické detekci produktu enzymatické hydrolýzy fluorescein diacetátu a získaný detekční limit byl 17 amol ve 2 ml (8,8 fM). Předpokládali jsme, že tato velmi sensitivní technika splňuje všechny požadavky pro rozpoznání počtu rostlinných buněk. A proto jsme fluorimetrické stanovení esterás použili pro analýzu rostlinných buněčných kultur (tabákové BY-2 buňky a raná somatické embrya smrku

ztepilého, klonu 2/32). Detekční limit byl v případě analýzy tabákových BY-2 buněk 0.5 buňky a v případě raných somatických embryí 1.5 embrya. A navíc jsme pomocí natolik sensitivní metody byly schopni studovat jednotlivé BY-2 protoplasty.

Klíčová slova: esterasy, fluoresceindiacetát, fluorimetrie, tabákové BY-2 buňky, Raná somatická embrya smrku ztepilého, protoplasty.

ÚVOD

Esterasy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících krátké uhlíkaté řetězce¹. V rostlinných buňkách a pletivech se účastní mnoha biochemických dějů, např. výstavby buněčné stěny², degradace některých xenobiotik^{3,4} a signálních procesů⁵. Na rozdíl od mikrobiálních¹ nejsou rostlinné esterasy používány jako biokatalyzátory v organické syntéze. Nicméně z výše uvedeného vyplývá, že představují značný potenciál pro rostlinné biotechnologie⁶⁻¹⁰. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterasy jako ukazatel životaschopnosti (viability)¹¹⁻¹³. Kromě toho některé práce upozornily na fakt, že je aktivita intracelulárních esteras buněčné suspenze přímo úměrná počtu živých buněk^{12,14,15}. Cílem této práce bylo využít intracelulární esterasy jako ukazatele hustoty živých buněk v několika experimentálních systémech a využít získaná data pro konstrukci růstové křivky.

MATERIÁLY A METODY

Chemikálie a přístroje

Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie dodané firmou Lachema Sigma Aldrich. Fluoresceindiacetát (FDA) byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA). Jeho roztok byl připraven rozpuštěním navážky v bezvodém acetonu. Na kultivační media byly použity chemikálie dodané firmou Duchefa Biochemie BV (Nizozemí). Media a roztoky byly připraveny rozpuštěním příslušných látek v deionizované vodě (18,2 MΩ, Iwa 20, Watek, Česká republika). Centrifugace byly provedeny na centrifuze MR 22 (Jouan, USA). Fluorescence byla měřena pomocí fluorimetru RF-551 (Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA)

Biologický materiál

Buněčná suspenze tabáku (*Nicotiana tabacum*) linie BY-2 byla udržována v tekutém Murashige-Skoog mediu¹⁶ modifikovaném podle Nagaty¹⁷. Suspenze (20 ml) v 50 ml Erlenmeyerových baňkách byla umístěna na třepačce (Kühner Shaker LT-W, Adolf Kühner AG, Švýcarsko) při 27±1°C a 135 ot.min⁻¹ ve tmě. Subkultivace probíhala dvakrát týdně. Pro experimenty byla použita kultura založená z 1 ml inokula. Raná somatická embrya smrku ztepilého klon. 2/32 ESE smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) byla kultivována na polotuhém LP mediu¹⁸ modifikovaném podle¹⁹. Ve stručnosti: Kolonie složené z mnoha ESE

byly umístěny na povrchu media ve 100 mm široké Petriho misce. Kultura byla udržována ve tmě při teplotě 23 ± 2 °C. Sub-kultivace byla prováděna po dvou týdnech. Pro účely experimentů byla kultura sledována v rámci jednoho týdne od založení. Růst kultury ESE byl sledován pomocí počítačové analýzy obrazu¹³. Počet ESE ve vzorku byl zjišťován na základě empirické korelace: 1 mg biomasy odpovídá 15 ESE¹³. Suspenzní kultura cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) byl odvozen na VFU v Brně²⁰ z báze cibule na modifikovaném Murashige-Skoog mediu I (obsahujícím 30 g/l sacharosy, 0,2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, 1 mg/l kyseliny 1-naftylacetové kyseliny a gelrit 1 g/l) a kalus byl dále udržován na modifikovaném Murashige-Skoog mediu II (obsahujícím 30 g/l sacharosy, 0,2 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxycetové, gelrit 1 g/l). Subkultivace probíhala jednou za měsíc. Suspenzní kultura byla připravena roztřepáním výše uvedeného kalusu v kapalném modifikovaném Murashige-Skoog mediu II (bez gelritu). Pro experimenty byla použita kultura založená přenesením 5 ml roztřepaného kalusu do 15 ml čerstvého Murashige-Skoog media II.

Test viability a stanovení hustoty suspenze

Vzorek kultury doplněný čerstvým médiem na objem 50 µl byl inkubován 5 min při pokojové teplotě s FDA ($1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a PI ($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)²³. Zastoupení živých (zeleně zbarvených) a mrtvých (červeně zbarvených) buněk bylo vyhodnoceno pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus AX 70) vybaveným pro širokopásmovou UV excitaci (kostka U-MWU). Hustota suspenze (počet buněk na ml suspenze) BY-2 byla stanovena mikroskopicky přímým počítáním pomocí Fuchs–Rosenthalovy komůrky.

Stanovení aktivity intracelulárních esteraz

Kultura cibule (1 ml) a kultura tabáku (0,2 ml) byla sklizena 10 min. centrifugací při 360 g a 20 °C. Shluky ESE byly odebrány z pevného media. Suspenze bakterií (1 ml) byla sklizena centrifugací při 2000 g a 20 °C. Získaná biomasa byla dvakrát promyta extrakčním pufrem (250 mM fosfát, pH 8,7). Veškerá biomasa byla uchovávána při –20 °C. Všechny vzorky byly po rozmrazení doplněny na celkový objem 1 ml resp. 0,2 ml v případě cibule extrakčním pufrem a desintegrovány ve skleněném pístovém homogenizátoru (Kavalier, Česká republika) uloženém v ledové lázni po dobu 10 min. K bakteriální biomase bylo přidáno 100 µl extrakčního pufru a cca 1/5 celkového objemu skleněného prachu (velikost částic 25 µm, Ultrasonic). Směs byla po 20 min. intenzivně protřepávána na vortexu při 4 °C a pak byla umístěna v ledu do ultrazvukové lázně po dobu 20 min. Získané rostlinné a bakteriální homogenáty byly centrifugovány (10 000 g, 15 min, 4 °C). Alikvot supernatantu byl přidán do reakční směsi obsahující fosfátový pufr (250 mM, pH 8,7) a 5 µM FDA, jehož zásobní roztok v bezvodém acetonu byl uchováván v uzavřených nádobkách při –20 °C. Množství acetonu v reakční směsi nepřekročilo 1 % (v/v). Po 15 minutové inkubaci

v termostatu při 35 °C byla změřena fluorescence (RF-551, Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA) – excitace 490 nm / emise 514 nm.

Aktivita esteras v IU (jedna mezinárodní jednotka uvolní při výše uvedených podmínkách 1 μ mol fluoresceinu za minutu) byla přepočítána na relativní hodnoty, kdy 100 % představuje nejvyšší naměřenou aktivitu v daném experimentu.

VÝSLEDKY A DISKUSE

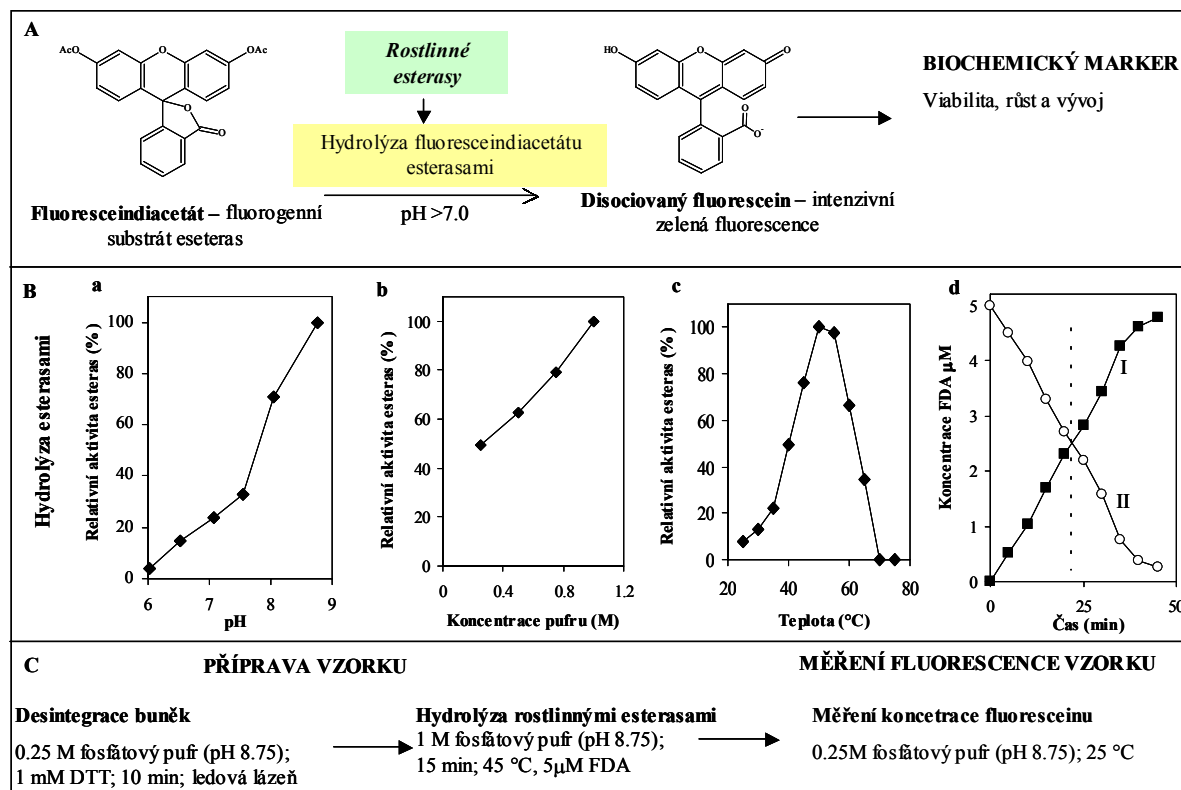
Esterasy jsou enzymy vykazující nízkou substrátovou specifitu¹. V naší práci jsme jako substrát zvolili fluoresceindiacetát (FDA)²⁴, kterým lze stanovit esterasy²⁵. Fluorescein, který z FDA vzniká působením esteras (Obr. 1), byl detekován spektrofotometricky. Nejdříve jsme se zabývali detekcí intracelulárních esteras v buněčné suspenzi tabáku linie BY-2, která je považována za jeden ze základních rostlinných modelových systémů v biologii rostlin¹⁷. Detekční limit fluoresceindiacetátového stanovení esteras představuje ekvivalent jednotek živých buněk BY-2. Díky vysoké citlivosti metody bylo možné použít malé množství vzorku buněčné suspenze (200 μ l). Studovali jsme možnost, zda lze data získaná měřením aktivity intracelulárních esteras využít ke konstrukci růstové křivky a nahradit tak časově náročné přímé počítání buněk pomocí Fuchs-Rosenthalovy komůrky. Ze suspenze byly v daných časech odebírány vzorky pro stanovení životnosti, buněčné hustoty (počet buněk na ml suspenze) a aktivity intracelulárních esteras. Růstová křivka byla sestavena na základě počtu živých buněk (celkový počet buněk $\times$ životnost) v 1 ml suspenze a naměřených aktivit intracelulárních esteras. Přímé počítání vykazuje experimentální chybu až 20 %. Naproti tomu využití intracelulárních esteras umožnilo významné snížení experimentální chyby (kolem 6%) a získaná křivka je v dobré korelaci s přímým počítáním buněk. Abychom prověřili zda intracelulární esterasy představují vhodný ukazatel využitelný pro konstrukci růstové křivky, byla sledována aktivita intracelulárních esteras konstantního množství živých buněk v různých časech kultivace. Na rozdíl od buněčné suspenze tabáku představuje kultura tvořená shluky somatických embryí na pevném mediu značně heterogenní systém. Růstová křivka byla sestavena na základě ploch shluků ESE zjištěných pomocí počítačové analýzy obrazu¹³. Na dvou diametrálně odlišných, dobře experimentálně definovaných rostlinných systémech jsme prověřili, že intracelulární esterasy mohou být využity pro určení růstové křivky. Proto jsme se pokusili ověřit metodiku stanovení aktivity intracelulárních esteras na suspenzní kulturu cibule kuchyňské. Námi vypracovaná metoda stanovení aktivity esteras umožnila ze získaných experimentálních dat sestavit růstovou křivku suspenzní kultury cibule.

Stanovení intracelulárních esteras v jednotlivých buňkách

Viabilita buněčné suspenze byla vedle mikroskopického počítání živých buněk (barvení pomocí fluoresceindiacetátu a propidiumjodidu) stanovena na základě aktivity intracelulárních esteras. Jako substrát esteras byl použit fluoresceindiacetát. Stanovení esteras bylo optimalizováno pro buněčný extrakt tabáku linie BY-2. Byly nalezeny tyto optimální parametry: Prostředí pro enzymovou

hydrolyzu fluoresceindiacetátu bylo tvořeno 1 M fosfátovým pufrům o pH 8,75. Reakční směs byla inkubována při teplotě 45°C po dobu 15 minut. Limit detekce představoval aktivitu esterasy odpovídající 1,5 buňkám tabáku linie BY-2. Navíc byla metoda aplikována na analýzu jednotlivých buněčných protoplastů. Pomocí tohoto postupu bylo možné studovat změny aktivity esterasy v jednotlivých buňkách.

Obr 1.: Stanovení intracelulárních esterasy: Schema reakce (A). Vliv pH (Ba) a koncentrace (Bb) fosfátového pufru, teploty (Bc) a doby inkubace (Bd, křivka I: intenzita signálu, křivka II koncentrace fluoresceindiacetátu). Schema zpracování vzorku (C).



ZÁVĚR

Z výše uvedeného vyplývá, že esterasy mohou sloužit jako vhodný univerzální marker pro stanovení růstových charakteristik buněk, jak eukaryotických, tak prokaryotických. Značnou výhodou představuje fakt, že se do stanovení aktivity intracelulárních esterasy promítnou pouze živé buňky, tedy takové které přispívají k růstu kultury a eventuálně produkují biotechnologicky významné metabolity. V případě rostlinných buněčných suspenzí lze pomocí stanovení esterasy nahradit přímé počítání buněk, které je časově značně náročné a nepřesné. Esterasy lze dokonce využít i tam, kde z důvodu přítomnosti velkých shluků buněk není přímé počítání možné. Navíc námi navržená metodika umožňuje analyzovat jednotlivé buňky.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 250061/2005.

LITERATURA

1. Bornscheuer U. T.: FEMS Microbiol. Rev., 26, 73 (2002).
2. Willats W. G. T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H. C., van Alebeek G.-J. W. M., Voragen A. G. J., Marcus S. E., Christensen T. M. I. E., Mikkelsen J. D., Murray B. S., Knox J. P.: J. Biol. Chem., 276, 19404 (2001).
3. Sandermann H.: Trends Biochem Sci, 17, 82 (1992).
4. Cummins I., Burnet M., Edwards R.: Physiol. Plant., 113, 477 (2001).
5. Stuhlfelder C., Lottspeich F., Mueller M. J.: Phytochemistry, 60, 233–240 (2002).
6. Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Kuban V.: Chem. Listy, 97, 1003 (2003).
7. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: Chem. Listy, 98, 166 (2004).
8. Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: Listy Cukrov, 120, 222 (2004).
9. Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: Bioelectrochemistry, 64, 10 (2004).
10. Zehnálek J., Vacek J., Kizek R.: Listy Cukrov, 120, 220 (2004).
11. Jones K. H., Senft J. A.: J. Histochem. Cytochem., 33, 77–79 (1985).
12. Víteček J., Adam V., Petřek J., Vacek J., Kizek R., Havel L.: Plant Cell Organ and Tissue Culture, 79, 195–201 (2004).
13. Petrek J., Vacek J., Vlasinova H., Kizek R., Prochazka S., Havel L.: Plant Cell Rep., *submitted*, (2004).
14. Amano T., Hirasawa K., O'Donohue M. J., Pernolle J., Schioi Y.: Anal. Biochem., 314, 1–7 (2003).
15. Steward N., Martin R., Engasser J. M., Goergen J. L.: Plant Cell Rep., 19, 171–176 (1999).
16. Murashige T., Skoog F.: Physiol. Plant., 15, 473 (1962).
17. Nagata T., Nemoto Y., Hasezawa S.: Int Rev Cytol, 132, 1 (1992).
18. von Arnold S. J.: Plant Physiol., 127, 233–244 (1987).
19. Havel L., Durzan D. J.: Int. J. Plant Sci., 157, 8–16 (1996).
20. Babula P.: článek v přípravě (2005).
21. Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Němec M.: Bioelectrochemistry, 60, 29–36 (2003).
22. Billova S., Kizek R., Jelen F., Novotna P.: Anal. Bioanal. Chem., 377, 362 (2003).
23. Mlejnek P., Prochazka S.: Planta, 215, 158 (2002).
24. Guilbault G. G., Kramer D. N.: Anal. Chem., 36, 409 (1964).

25. www.molecularprobosc.com: (2004).
26. Víteček J., Kizek R., Petřek J., Vacek J., Havel L.: 5 th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology, *1*, 159 (2003).
27. Víteček J., Kizek R., Petřek J., Havel L.: 3. Metodické dny, 73 (2003).
28. Víteček J., Kizek R., Petřek J., Vacek J., Havel L.: MendelNET, 47 (2003).
29. www.sigmaaldrich.com: (2003).
30. Gilot P., Andre P.: Appl Environ Microbiol., *61*, 1661 (1995).
31. Choi Y.-J., Lee B. H.: Bioprocess and Biosystems Engineering, *24*, 59–63 (2001).
32. Aldridge W. N.: Biochem J., *53*, 110 (1953).