

VYSOKOŠKOLSKÉ SKRIPTÁ

Pedagogická fakulta Trnavskej univerzity



Pavol Múdry

**POLYMORFIZMUS ENZÝMOV RASTLÍN
V BIOLÓGII A V BIOTECHNOLÓGII**

1. časť

Metodológia elektroforetickej separácie izoenzýmov

2011

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2011

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.

Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity dňa 2011 ako skriptá pre Pedagogickú fakultu TU.

ISBN 978-80-8082-502-7

PREDHOVOR

Súčasní študenti a absolventi biológie na našej pedagogickej fakulte budú vzdelávať a vychovávať žiakov základných a študentov stredných škôl v prvom storočí tretieho tisícročia, ktoré bude charakterizované pokračujúcim rozvojom molekulárnej biológie, biochémie a genetiky. Počas štúdia biológie si osvojujú základné poznatky, ako sú molekulová stavba bielkovín, stavba nukleových kyselín, prenos genetickej informácie, syntéza bielkovín atď. Aký je však teoretický a praktický význam proteomiky a genomiky pre rozvoj biotechnológií, čo sú modifikované organizmy, v čom spočíva transgenóza, čo sú to explantátové kultúry atď. - na tieto otázky vie zareagovať len nepatrný zlomok študentov. Príčiny možno vidieť v tom, že v základných disciplínach niet priestoru pre riešenie závažných otázok moderného vedeckého bádania a výrobnjej praxe. Dôležitou a trvalou úlohou učiteľa biológie je, a v budúcnosti naďalej zostane, pôsobiť na profesionálnu orientáciu najmä študentov stredných škôl pri výbere ďalšieho štúdia alebo zaradenia sa do výrobného procesu. Iba učiteľ adekvátne teoreticky pripravený odpovedať aj na hore uvedené otázky, má šancu pre úspešné formovanie žiakov v intenciách modernej vedy a požiadaviek výrobnjej praxe. Bolo by neodpušiteľné, ak v čase zakladania a pôsobenia fakúlt a katedier biotechnológií na vysokých školách a univerzitách, by učiteľ nebol schopný zanietiť študentov aj pre tento smer štúdia. Preto sa do študijných plánov fakulty zaviedol predmet biotechnológia, ktorý sa stal pre stupeň magisterského štúdia povinne voliteľným predmetom. Naši študenti magisterského aj bakalárskeho stupňa štúdia, študenti doktorandského štúdia a vedecí pracovníci z fakúlt iných univerzít a vedeckých pracovísk už pätnásť rokov prejavujú aktívny záujem o výskum a aplikáciu polymorfizmu enzýmov v praxi. Impulzom pre napísanie vysokoškolských učebných testov boli aj skutočnosti, ako uplatnenie polymorfizmu enzýmov (jednoduché markery štruktúrnych génov) v biotechnológii a absencia dostupnej literatúry v slovenskom jazyku, ktorá by riešila teoretickú, analytickú i praktickú stránku využitia polymorfizmu enzýmov.

Učebné texty sú koncipované tak, že za každou kapitolou sú formulované otázky, na ktoré by mal študent vedieť odpovedať. Rozsah, ktorý je vymedzený pre napísanie učebných textov, neumožňuje riešiť polymorfizmus všetkých aktuálnych druhov enzýmov známych z vedeckej literatúry. Preto je riešený polymorfizmus enzýmov najčastejšie študovaných druhov enzýmov a hlavne tých, s ktorými máme v našom laboratóriu dlhoročné experimentálne skúsenosti.

Pevne verím, že práca pomôže vniknúť do metodológie analýzy, poznania a interpretácie polymorfizmu enzýmov nielen študentom biológie, biochémie a biotechnológií, ale aj vedeckým pracovníkom, ktorí budú chcieť obohatiť metodológiu svojej vedeckej práce o túto vo vedeckej literatúre pomerne frekventovane prezentovanú oblasť.

RNDr. Pavol Múdry, CSc.

autor

1 ÚVOD

Rozvoj molekulovej biológie, biochémie a genetiky výrazne ovplyvnil metodológiu analýzy, poznanie štruktúry, genetickú interpretáciu a využívanie poznania polymorfizmu enzýmov v rozmatitých teoretických aj aplikačných rovinách. Polymorfizmus enzýmov je fenomén, ktorý je známy v biochemickom a biologickom výskume už viac ako päťdesiat rokov. Počas tohoto obdobia sa naakumulovalo množstvo údajov a poznatkov, ktoré našli uplatnenie v rozmanitých oblastiach vedeckého bádania, predovšetkým však v tých, kde sa dalo využiť poznanie rozsahu variability (diverzity) enzýmov. Výskum na poli polymorfizmu enzýmov významne zasiahol do biochémie, genetiky a šľachtenia, hlavne populačnej genetiky, ekofyziológie, systematickej botaniky, cytológie, histológie, organológie, ontogénie a fylogénie, fytopatológie, rastlinnej výroby atď. Výnimkou nie je ani biotechnológia, ktorá poznanie diverzity enzýmov využíva v šľachtení asistovanom polymorfizmom enzýmov - jednoduchých molekulárnych markérov štruktúrnych génov, ďalej pri hodnotení identity buniek, pletív, orgánov a rastlín vypestovaných v in vitro podmienkach, pri tvorbe geneticky modifikovaných organizmov pri známej polohe polymorfného lokusu enzýmu na chromozóme donora, alebo priamo v priemyselnej výrobe. Objektom štúdia polymorfizmu enzýmov môže byť každý živý systém, ktorý je schopný syntetizovať enzýmy. Sú známe práce dokumentujúce polymorfizmus enzýmov húb, baktérií, živočíchov, rastlín aj človeka. Najintenzívnejšie sa študuje a je publikovaná diverzita enzýmov rastlín. Čo je pochopiteľné, pretože rastlinný materiál pre výskum je dostupnejší, zvyčajne lacnejší a deštrukčná práca etickejšia, ako na materiáli živočíšneho pôvodu. Medzi veľmi dobre preštudované rastlinné druhy patria predovšetkým hospodársky významné druhy. Z poľnohospodárskych druhov sú to predovšetkým kukurica siata (*Zea mays* L.), slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.), sója fazuľová (*Glycine max* [L.] Merr.), hrach siaty (*Pisum sativum* L.), husto siate obilniny, trávy a z drevín sú to lesné dreviny a ovocné dreviny. O intenzite štúdia rozhoduje hospodársky význam druhu, rozsah variability polymorfizmu enzýmov a s tým spojený spôsob množenia (rozmnožovania) – autogamia (samoopelenie) alebo allogamia (cudzoopelenie) a prevažne kodominantný spôsob prejavu (expresie) alel polymorfného lokusu. Pri analýzach polymorfizmu enzýmov najčastejšou metódou je elektroforéza na zvolenom médiu (nosiči). Najčastejšie využívanou metódou je metóda horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle, ktorej sa v rámci metodológie výskumu polymorfizmu enzýmov budeme venovať aj v týchto skriptách. Každá metóda umožňuje do určitej miery poznať exaktne skúmaný objekt, jav alebo zákonitosť. Na prvý pohľad by sa mohlo zdať, že elektroforéza je metóda z hľadiska

používaných prístrojov a materiálneho vybavenia pomerne jednoduchá. V prípade separácie izoenzýmov a ich genetickej interpretácie je mimoriadne dôležité precízne dodržiavanie kultivačných a experimentálnych podmienok. Metóda vyžaduje značnú experimentálnu skúsenosť a dlhodobjšiu prax. Často pri banálnej nepozornosti je nevyhnutné analýzu zopakovať, lebo hrozí, že izozymogramy (obraz systému vyfarbených zón enzymatickej aktivity) budú nekompletné alebo nečitateľné, a teda nepravdivé. Zvládnutie metodologického postupu v spojení s inými výskumnými metódami rozhodne prispieva ku komplexnejšiemu a pravdivejšiemu poznaniu rastlinných organizmov, javov a zákonitostí na úrovni buniek, pletív, orgánov, druhov, vnútro- a medzipopulačných vzťahov.

Otázky: 1. Čo je objektom štúdia polymorfizmu enzýmov?

2. V ktorých vedných disciplínach sa realizuje výskum polymorfizmu enzýmov?

3. Čo rozhoduje o intenzite štúdia polymorfizmu enzýmov konkrétneho rastlinného druhu?

2 POLYMORFIZMUS ENZÝMOV

2.1 POLYMORFIZMUS VŠEOBECNE

Termín **polymorfia** je gréckeho pôvodu a skladá sa z dvoch slov **poly-** (znamená mnoho, množstvo, viacnásobnosť, mnohosť) a **- morfia** (zn. tvárnosť, tvar, tvarový). Potom polymorfný bude mať význam mnohotvárný alebo mnohostný a polymorfizmus bude všeobecne vyjadrovať existenciu druhu v niekoľkých variétach, teda jeho mnohotvárnosť.

Z pohľadu genetiky – genetický polymorfizmus na úrovni živých systémov vyjadruje existenciu odlišných foriem sekvencií DNA. Polymorfizmy sú typom genetickej diverzity vo vnútri genofondu (súboru génov). Môžu sa využívať na lokalizáciu (mapovanie) génov, a tak je ich možné použiť na určenie zdroja analyzovanej vzorky. V skutočnosti v závislosti od povahy, polymorfizmus môže alebo nemusí ovplyvniť biologickú funkciu. Poradie aminokyselín v proteínoch je pod priamou kontrolou informácie v génoch. Gény, ktoré majú odlišné sekvencie DNA sa nazývajú polymorfné. Tieto odlišné formy génu sa nazývajú **alely**. Ak alely spôsobujú odlišnosti v poradí (sekvencii) aminokyselín v bielkovine, bielkoviny kódované alelami sa nazývajú izoformy. Miesto výskytu génu na chromozóme je jeho **lokus**.

Polymorfizmy vznikajú prostredníctvom mutácií, ktoré môžu byť spôsobené výmenou jedného typu nukleotidu za iný, včlenením (inzerciou) alebo stratou (deléciou) alebo novým

usporiadaním (zoskupením) nukleotidov. Tak sa polymorizmus môže dediť podobne, ako akákoľvek sekvencia DNA z rodičov na potomstvo. Vzhľadom na veľkú časť DNA, ktorá nekóduje syntézu bielkovín, sa polymorfizmy našli aj mimo gény. V skutočnosti úseky DNA, ktoré nekódujú syntézu bielkovín, majú tendenciu tvoriť viac polymorfizmov. Polymorfizmy, ktoré nemajú žiaden vplyv na organizmus sa nazývajú **selektívne neutrálne**, pretože neovplyvňujú jeho schopnosť prežiť a rozmnožovať sa. Proces určovania geneticky podmienených polymorfizmov jedinca je známy ako **genotypovanie**. Jedna z najstarších metód genotypovania je metóda detekcie izoenzýmov alebo izozýmov. Izoenzýmy sú odlišné formy proteínu s jemne odlišnou skladbou aminokyselín, ktorá je geneticky programovaná prostredníctvom DNA (Nelson 2003).

2.2 STRUČNÁ HISTÓRIA VÝSKUMU POLYMORFIZMU ENZÝMOV

Polymorfizmus enzýmov bol pozorovaný podstatne skôr, ako sa o ňom začalo vážne uvažovať. Už v roku 1940 ho opísal Theorell, ale biologický význam tohoto fenoména bol docenený podstatne neskôr (Scandalios 1975). Až prehĺbenie poznatkov a zdokonalenie metodologických prístupov v biochémií potvrdilo, že polymorfizmus enzýmov je niečo zákonité v živých systémoch a nie iba náhoda. Už začiatkom päťdesiatych rokov bolo známych niekoľko prác, ktoré dokumentovali existenciu rastlinných enzýmov v mnohotných (multiplicitných) formách. I keď huby nie sú rastliny, prvé práce prítomnosť mnohotných foriem enzýmov dokazujú práve prostredníctvom analýz húb. Podrobný historický prehľad prác uvádza McMillin (1983). V roku 1949 Maliette a Dawson získali päť čistých preparátov tyrozinázy z druhu huby *Psaliota campestris*. Prítomnosť rozdielnych foriem amylázy, pektínesterázy a polygalakturonázy v mikroskopických hubách použijúc metódu papierovej chromatografie a elektroforézy na agarových géloch pozoroval Reid (1950), papierovou chromatografiou prítomnosť rôznych foriem invertázy kvasiniek pивných Cabib (1952), amylázy ryže Giri *et al.* (1952). Krebs (1953) izoloval niekoľko foriem triózfosfátdehydrogenázy z kvasiniek, porovnávajúc výsledky papierovej chromatografie a elektroforézy na papieri huby *Aspergillus oryzae* a v chrene zistili rôzne formy esterázy, amylázy, β -glukozidázy, sacharázy, celulázy, proteázy a alkalickéj fosfatázy Gillespie *et al.* (1952). McMillin uvádza polymorfizmus kyslej fosfatázy v listoch pšenice (Roberts 1956), peroxidáz cukrovej repy, tabaku, špenátu (Boroughs 1954). V týchto rokoch existovali protirečivé názory na existenciu polymorfných foriem enzýmov. Predpokladalo sa, že sú to

artefakty, ktoré vznikajú homogenizáciou, extrakciou a purifikáciou analyzovaných vzoriek. McMillin uvádza, že až práca, ktorú publikoval Jermyn a Thomas (1954) a týkala sa analýzy odlišných foriem peroxidázy vyvrátila, že by šlo o artefakty. Dokázali, že každá z foriem má odlišné vlastnosti. K vyriešeniu problematiky významne prispelo skvalitnenie metodológie elektroforetickej separácie látok. Prvým metodologickým krokom bolo vyvinutie elektroforézy na škrobovom géle autorom Smithies (1955). Druhým bolo zistenie, že je možná vizualizácia izoform na škrobovom géle použitím vyfarbovacích postupov známych z vyfarbovania živočíšnych tkanív (Hunter a Markert 1957). **Hunter a Markert (1957) navrhli, aby systém pásov zodpovedajúcich miestu výskytu enzýmov sa nazýval zymogram. Markert a Möller (1959) ako prví vyslovili termín izozým na označenie odlišných molekulových foriem enzýmov s rovnakou substrátovou špecifitou.** Analýzou a štúdiom polymorfizmu laktátdehydrogenázy v hovädzom srdci, v srdci ovce, prasťa, myši a kráľika ukázali, že izoenzýmy boli tkanivovo, vývojovo a druhovo špecifické. Dnes je už všeobecne známe, že fytopatogén môže vyvolať v hostiteľskej rastline syntézu špecifických izoform, že fytohormóny môžu ovplyvniť prejav polymorfizmu a aj cudzorodé látky (xenobiotiká) majú podobný efekt. Vývin rastlinného organizmu od embrya po dospelosť je sprevádzaný biosyntézou enzýmov nevyhnutných pre biochemické reakcie v odlišných bunkách, pletivách a orgánoch. Prejav súboru enzýmov je riadený regulačnými lokusmi. Regulácia sa môže prejaviť na úrovni transkripčnej, posttranskripčnej, translačnej a posttranslačnej.

2.3 PÔVOD IZOENZÝMOV A IZOENZÝMOVÝCH SYSTÉMOV

Termín izozýmy (izoenzýmy) sa používa na vyjadrenie existencie odlišných molekulárnych foriem nejakého enzýmu v konkrétnom druhu, ktoré vykazujú rovnakú katalytickú aktivitu. Iná definícia upresňuje tento termín a hovorí, že izoenzýmy sú mnohotné molekulárne formy enzýmov pochádzajúce z toho istého organizmu alebo pletivovej kultúry, ktoré majú rovnakú katalytickú aktivitu. Izoenzýmy možno vymedziť nasledovne:

1. Izoenzýmy – sú odlišné molekulárne formy enzýmov bežne sa vyskytujúce v organizmoch.
2. Izoenzýmy majú rovnakú katalytickú aktivitu. Každý izoenzým má svoju špecifickú úlohu v metabolizme a účinkuje harmonicky s inými enzýmami vo vnútri organizačnej úrovne buniek.
3. Izoenzýmy sú často v pletivách a bunkách špecifické.

4. Heterogenita (rôznosť) molekúl izoenzýmov organizmu poskytuje flexibilitu, mnohostrannosť a presnosť prostredníctvom metabolických funkcií.
5. Multiplicita molekúl je prostriedkom pre biologickú výkonnosť alebo zdatnosť organizmu.

Keďže každý gén môže zmutovať, tak potom každý enzým môže existovať ako allelický izozým (izoenzým).

Pôvod vzniku izoenzýmov v prírode má príčiny **genetické** a **epigenetické**. Pôvod rôznych foriem génu možno pripísať zdvojeniu génu kódujúceho enzým s následnou divergenciou prostredníctvom mutácie, čo vedie k produkcii odlišných enzýmov. Môžeme sem zahrnúť polyploidizáciu (zdroj duplikácie génu) celého genómu alebo jeho časti. Genetickou príčinou vzniku izoenzýmov sú chromozómové a génové aberácie.

Polypeptid vzniknutý prekladom genetickej informácie kódovanej v DNA podlieha posttranslačným úpravám, čo môže viesť k vzniku rôznych foriem enzýmov. Epigeneticky vzniknuté enzýmy však mnohí výskumníci nepovažujú za izoenzýmy.

Acquaah (1992) uvádza nasledovné **genetické mechanizmy** vzniku izoenzýmov **mnoholokusový systém I, mnoholokusový systém II, jednolokusovo-polymérny systém a alozýmový systém.**

Mnoholokusový systém I – je mechanizmus vzniku izoenzýmov, kedy odlišné gény kódujú syntézu rôznych proteínov s rovnakou enzymatickou aktivitou. Gény sú pôvodom jadrové, ale ich produkty – proteíny sa nachádzajú v odlišných častiach bunky, napr. jeden v cytoplazme, iný v chloroplaste a ďalší v mitochondrii. Enzýmy tejto kategórie sú si funkčne podobné. Ako príklad možno uviesť enzým malátdehydrogenázu.

Mnoholokusový systém II – je **podobný systému I** s tým, že enzýmy sú polymérne, t.j. na ich stavbe sa podieľa viac, ako jeden polypeptidový reťazec, a tie sú kódované viac ako jedným lokusom. V tomto systéme ide o tvorbu homomultimérnych enzýmov (mnohotné peptidové reťazce sú rovnaké) a heteromultimérnych enzýmov (mnohotné peptidové reťazce nie sú rovnaké alebo hybridné izoenzýmy). Príkladom je laktátdehydrogenáza.

Jednolokusovo-polymérny systém vyjadruje situáciu, kedy enzýmy sú tvorené skupinou polymérov, ktoré pozostávajú z rovnakých podjednotiek. Významné pri tvorbe izoenzýmov sú v tomto prípade mutácie alebo prítomnosť alelických génov. Príkladom enzýmu tejto kategórie je glutamátdehydrogenáza.

Alozýmový systém – sa týka izoenzýmov (alozýmov) kódovaných alelickými génmi. Alely rôznych lokusov môžu byť modifikované a tvoriť izoenzýmy, ktoré su zastúpené

v populácii podľa Mendelových zákonov dedičnosti. Ak je nejaký enzým multiméerný, heterozygotní jedinci tvoria homomérov aj heteromérov.

K epigenetickým mechanizmom vzniku izoenzýmov patria – post-translačná adícia, post-translačná delícia a post-translačná konformácia. Post-translačné modifikácie môžu byť kovalentné alebo nekovalentné a môžu zahŕňať zmeny spôsobené takými procesmi, ako sú fosforylácia, agregácia, deaminácia, acylácia, čiastočné štiepenie reťazca a asociácia s inými proteínmi.

Post-translačná adícia spočíva v zmene polypeptidových reťazcov, ktoré sú spôsobené naviazaním sa alebo kombináciou v cytoplazme prítomných molekúl na polypeptidový reťazec procesom fosforylácie. Izoenzýmy fosfatázy sa zvyčajne tvoria post-translačnou adíciou.

Post-translačná delícia spočíva v tom, že počas tvorby produktov translácie, môžu byť odstránené terminálne fragmenty z polypeptidového reťazca, ako v čiastočnej proteolýze, výsledkom ktorej je z trypsinogénu trypsin. Izoenzýmy peptidázy sú často tvorené post-translačnou delíciou.

Post-translačná konformácia je založená na štruktúrnej konfigurácii proteínov. Izoenzýmy vzniknuté takýmto spôsobom sa nazývajú konformačné izoenzýmy. Konformačné zmeny polypeptidových reťazcov vedú k zmene pomeru karboxylových a aminoskupín, čo vedie k rozdielnemu náboju, a teda rozdielnej pohyblivosti proteínov v elektrickom poli.

Otázky: 1. Čo vyjadruje termín polymorfia?

2. Ako sa nazýva miesto výskytu génu na chromozóme?

3. Ako vznikajú polymorfizmy v živých systémoch?

4. Čo sú to polymorfizmy selektívne neutrálne?

5. Čo je zymogram, kto a kedy tento termín zaviedol?

6. Ktorí autori a kedy zaviedli termín izozým?

7. Čo sú izozýmy alebo izoenzýmy?

3 ELEKTROFORETICKÁ SEPARÁCIA IZOENZÝMOV

3.1 TYPY TECHNÍK ELEKTROFORÉZY A ZÁKLADNÉ POJMY

Keďže izoenzýmy sa navzájom odlišujú zložením aminokyselín v proteínoch, preto sa budú odlišovať veľkosťou molekúl a elektrickými nábojmi. Na separáciu jednotlivých

izoforiem sa najčastejšie využíva metóda elektroforézy na géloch.

Elektroforéza je mnohostranná biochemická technika separácie a analýzy látok. Je to analytická technika, ktorú po prvý raz predstavil Tiselius (1937). Známe sú dva varianty elektroforézy. Prvý nevyužíva žiadne separačné médium. Molekuly, ktoré majú byť oddelené sa nachádzajú v spoločnom roztoku, v ktorom sa voľne pohybujú. Využitím elektrického gradientu sa molekuly začnú pohybovať smerom k tej elektróde, ktorá má opačný náboj. V pôvodnom roztoku so zmesou molekúl sa vytvorí niekoľko ohraničených vrstiev podľa relatívnych mobilit (pohyblivosti) odlišných komponentov v zmesi. Táto technika bola vhodná pre analýzu zmesi komplexu proteínov. Druhá technika nazývaná **zonálna elektroforéza** je založená na separácii látok na pevnom nosiči (médiu). Je vhodná a využívaná aj na separáciu a identifikáciu variability polymorfizmu enzýmov. Keďže molekuly bielkovín majú náboj budú sa pohybovať v elektrickom poli. Na separáciu izoenzýmov sa najčastejšie používa elektroforéza na škrobovom géle, ktorú vyvinul Smithies (1955). Metódu použili Hunter a Markert (1957) a pripojením metódy histochemického farbenia zón enzymatickej aktivity, vyvinuli **techniku zymogramu** lokalizácie zón enzymatickej aktivity priamo na pevnom nosiči (médiu), na ktorom sa uskutočnilo delenie. Prostredníctvom farbenia zymogram odhaľuje farebné škvrny (pásky), ktoré korešpondujú s polohami na separačnom médiu, do ktorých migrovali rôzne izoenzýmy na základe ich vlastností a experimentálnych podmienok. Vzory zymogramov sú **“fingerprinty“** (odtlačky prstov) konkrétnych enzýmov.

3.2 SEPARAČNÉ MÉDIÁ POUŽÍVANÉ V ELEKTROFORÉZE

Delenie molekúl bielkovín možno zrealizovať na pevných médiách, ktoré sa rozdelia podľa ich vplyvu na pohyb molekúl bielkovín na:

- a) **pasívne médiá**, ktoré nevplývajú na pohybujúce sa molekuly – papier, celulózo-acetát, oxid hlinitý, oxid kremičitý,
- b) **aktívne médiá**, ktoré majú dodatočný vplyv na pohyb molekúl prostredníctvom vlastností molekulových sít – agarózové, škrobové a polyakrylamidové gély.

Separáčne médiá sú elektroneutrálne a majú svoje výhody aj nevýhody. Agarózové gély sú krehké a lámavé, používajú sa v elektroforetických zariadeniach pre horizontálnu krátkodobú elektroforézu. Polyakrylamidové gély sú chemicky aj mechanicky stabilné, majú dobrú deliacu schopnosť a využívajú sa v zariadeniach na vertikálnu elektroforézu.

Nevýhodou je, že akrylamid je neurotoxín, a preto sa musí s ním manipulovať veľmi opatrne. Celulózo – acetátové nosiče zabezpečujú vysokokvalitnú separáciu, ale ich nevýhodou je vysoká cena a krátkodobá separácia (elektroforéza nie dlhšia, ako jedna hodina). Obrovskou výhodou škrobových gélov je ich nižšia cena a hlavne to, že je ich možné rezať na niekoľko plátov (vrstiev), čo umožňuje stanoviť polymorfizmus niekoľkých odlišných druhov enzýmov, rozlišovacia kvalita týchto gélov je však menšia. Používajú sa v horizontálnej elektroforéze. Je najčastejšie používaným nosičom pri analýze polymorfizmu enzýmov. Pri výbere separačného média, na ktorom sa uskutočňuje separácia bielkovín by si mal výskumník zvážiť cenu, bezpečnosť, trvanie elektroforézy, pracnosť a špeciálne výhody, ako je možnosť rezať gély.

3.3. VIZUALIZÁCIA GÉLOV

Nevyhnutnou požiadavkou na elektroforetickú separáciu molekúl bielkovín je úspešná separácia do tej kvality, ktorá umožňuje jednoznačné určenie odlišností medzi genotypmi. Elektroforézou musí byť zabezpečená jednak **kvalitná separácia** odlišných proteínov, čo sa prejaví vzdialenosťou medzi pásmi (pásky, resp. škvrny sú zreteľne od seba oddelené) a **rozlišovacia schopnosť**, ktorá sa týka šírky a ostroty pásov. Existuje veľa faktorov, ktoré ovplyvňujú kvalitu separácie aj rozlišovacej schopnosti izozymogramov. Túto problematiku z teoretického a hlavne praktického pohľadu dobre hodnotí Acquaah (1992).

Významný vplyv na elektroforetickú separáciu izoenzýmov majú **systemy tlmivých roztokov**, ktoré sú kombináciou gélových a elektródových tlmivých roztokov, zložených zo špecifických druhov iónov, iónovej sily a pH tlmivej kapacity tlmivých roztokov. Posledná hodnota je oveľa dôležitejšia, ako je samotné zloženie tlmivých roztokov. Tlmivé roztoky sú v elektroforéze potrebné na to, aby dodávali elektrickú vodivosť inak elektricky neutrálnym separačným médiám (nosičom) a na udržanie molekúl proteínov v aktívnom fyziologickom stave. V tomto prípade tlmivé roztoky pôsobia ako elektrolyty, na extrakciu proteínov a farbenie gélov.

Tlmivé roztoky podľa vplyvu na integritu (celistvosť) molekúl proteínov možno rozdeliť na **disociujúce tlmivé roztoky** a **nedisociujúce tlmivé roztoky**. Pri **disociujúcich tlmivých roztokoch** dochádza k denaturácii molekúl proteínov a stávajú sa fyziologicky inaktívne. Výsledkom je disociácia molekúl proteínov na ich komponentné podjednotky (polypeptidy). V tlmivom roztoku tohoto druhu separácia molekúl prebieha hlavne na základe veľkosti molekúl.

Nedisociujúce tlmivé roztoky chránia molekulovú integritu proteínov, ktoré zostávajú fyziologicky aktívne. Separácia molekúl sa v tomto prípade uskutočňuje na základe náboja aj veľkosti molekúl.

Vplyv iónových vlastností tlmivých roztokov na elektroforézu. Tlmivý roztok na prípravu gélu (gélový tlmivý roztok) nízkej iónovej sily má vplyv na rýchlejší pohyb nabitých molekúl (kratší čas elektroforézy) a slabé zahrievanie gélu. Opačne, vysoká iónová sila spôsobuje pomalý pohyb molekúl a silnejšie zahrievanie separačného média. Má tendenciu k tvorbe ostrejších pásov. Platí zásada, že iónová sila gélového tlmivého roztoku by mala byť nižšia, ako je iónová sila na prípravu elektródového tlmivého roztoku. Výskumníci môžu upravovať iónovú silu tlmivých roztokov, pokiaľ nedosiahnu požadované kvalitatívne parametre separácie. Iónové vlastnosti a pH tlmivých roztokov ovplyvňuje rozlišovanie izoenzýmov. Na základe iónových vlastností možno tlmivé roztoky rozdeliť na **kontinuálne a diskontinuálne**.

Kontinuálne – sú tlmivé roztoky, ktoré majú rovnaké iónové zloženie (oba aj gélový aj elektrolytový tlmivý roztok). Koncentrácia iónov môže byť odlišná, ale zvyčajne gélový tlmivý roztok je menej koncentrovaný. Rovnaké je zvyčajne pH tlmivých roztokov. Ako príklad možno uviesť:

elektrodový tlmivý roztok: $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$	
tris-citrát	pH = 6,5
gélový tlmivý roztok: 1:3 roztok elektródového	
tlmivého roztoku	pH = 6,5.

Diskontinuálne – sú viacfázové tlmivé roztoky, kde zloženie gélového i elektródového tlmivého roztoku je odlišné a odlišné môže byť aj pH. Ako príklad tohoto typu tlmivého roztoku možno uviesť:

elektrodový tlmivý roztok: $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$	
tris-citrát	pH = 7,1
gélový tlmivý roztok: $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$	
histidín-HCl	pH = 7,5.

Výber tlmivého roztoku pre elektroforézu je veľmi dôležitý. Zohrávajú význam aj také faktory, ako sú cena, ľahká príprava a bezpečnosť. Tris systém tlmivých roztokov je lacnejší, ako histidínový systém. Tris tlmivé roztoky tvoria menej problémov spojených s mikrobiálnou kontamináciou ako fosfátové tlmivé roztoky. Niektoré tlmivé roztoky vyžadujú zvláštnu pozornosť pri ich príprave. Iné sú menej toxické. Na prípravu niektorých tlmivých roztokov je potrebné pridávať aditíva, ako sú EDTA (kyselina etyléndiamín tetraoctová) a sacharóza na zvýšenie rozlišovacej schopnosti izoenzýmov na zymogramoch.

Niektoré z týchto reagentov sú inhibítormi, ktoré potláčajú alebo eliminujú prejav náhodných pásov, ktoré komplikujú čítanie zymogramov.

Biochémia proteínov. Proteíny sú polyméry 22 aminokyselín. Polypeptid má špirálovitú kosťru (α - helix), ktorá je základom sekundárnej štruktúry bielkovín a bočné reťazce (označujúce sa R) tvorené radikálmi aminokyselín. V sekundárnej štruktúre bočné reťazce sú umiestnené zvonka špirály a môžu byť ionizované v závislosti od ionizačných vlastností rozpúšťadla, v ktorom je proteín rozpustený. Podľa charakteru R – radikálu **aminokyseliny** možno zaradiť do troch skupín na **nepolárne** bez náboja (alanín, izoleucín, leucín, metionín, fenylalanín, prolín, tryptofán a valín), **polárne** bez náboja (asparagín, cysteín, glycín, glutamín, serín, treonín, tyrozín) a **polárne s nábojom** (arginín, kyselina asparágová, kyselina glutámová, histidín a lyzín). Jedinečnosť aminokyselín je podmienená charakteristikou R – radikálu. Aminokyseliny sa odlišujú nielen R - radikálom, ale aj molekulovou hmotnosťou. Odlišné aminokyseliny sa viažu lineárne do peptidového reťazca prostredníctvom peptidových väzieb v rôznych kombináciách a sekvenciách, a tak tvoria špecifické proteíny. Náboj bielkoviny bude závisieť od jej aminokyselinového zloženia. Ak je súčet pozitívne nabitých aminokyselín väčší ako negatívne nabitých, výsledný náboj bielkoviny bude kladný a bude sa pohybovať v elektrickom poli smerom ku katóde. Substitúcie v tripletovom kóde mohli viesť k tvorbe odlišných aminokyselín a následne k tvorbe rôznych bielkovín s odlišnými celkovými nábojmi. Nové bielkoviny sú fyziologicky aktívne a možno ich elektroforeticky odlíšiť od pôvodných – originálnych, lebo majú preukazne odlišný náboj.

Úloha pH roztokov je jedným z najdôležitejších faktorov, ktoré vplývajú na elektroforetickú separáciu izoenzýmov, pretože mnohé aminokyseliny sú neutrálne ($\text{pH} = 7$), a teda záporné a kladné náboje sú vyrovnané. V tomto stave sú **amfoternými iónmi (zwitteriony)**. Tieto aminokyseliny majú karboxylovú – kyslú ($-\text{COOH}$) aj amino – zásaditú ($-\text{NH}_2$) skupinu. Celkový náboj aminokyseliny ovplyvňuje pH prostredia, v ktorom sa nachádza. Disociáciou karboxylovej skupiny vzniká záporný náboj ($-\text{COOH} = -\text{COO}^- + \text{H}^+$) a disociáciou aminoskupiny kladný náboj ($-\text{NH}_2 + \text{H}^+ = -\text{NH}_3^+$). Celkový náboj bielkoviny je rovný nule, ak sa nachádza v izoelektrickom bode. Ak sa začne meniť pH prostredia jedným alebo druhým smerom, začína sa meniť aj celkový náboj bielkoviny, podľa toho, koľko karboxylových a koľko aminokyselín je ionizovaných. Rýchlosť pohybu bielkoviny v elektrickom poli je závislá od veľkosti jej náboja. Aby sa bielkovina v elektrickom poli pohybovala len jedným smerom, pH elektroforetického tlmivého roztoku musí byť

konštantné, aby nedošlo k zmene pôvodného náboja bielkoviny. Na dosiahnutie tohto stavu, roztoky na prípravu gélu a elektroforetické roztoky, musia rýchlo tmiť možné výkyvy pH. Na dosiahnutie určitej kvality separácie izoenzýmov možno zasahovať do zloženia tlmivých roztokov. Zmeny však musia byť citlivé, pričom platia určité zásady. Musí byť zachovaná čo najmenšia iónová sila separačného média (nosiča), aby sa predišlo prehriatiu gélu. Väčšina proteínov má hodnotu pH izoelektrického bodu v rozpätí medzi 4 až 7, preto sa najčastejšie používajú tlmivé roztoky v hodnotách pH medzi 8 až 9,5.

Vplyv veličín jednosmerného prúdu na tvorbu elektrického gradientu, na základe ktorého sa molekuly s nábojom separujú, je evidentný. Elektroforetická separácia nabitých látok je možná vzhľadom na vzájomnú prepojenosť dvoch zákonitostí, a to že a) **elektrický prúd je (I, ampéry) je priamo úmerný napätiu (V, volty) a nepriamo úmerný odporu (R, ohmy)** - matematický $I = V/R$ a b) **výkon (W, waty) je priamo úmerný napätiu a prúdu**. Vznikajúce teplo počas elektroforézy je spôsobené odporom deliaceho média (nosiča), ktorý je spôsobený jeho chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami. Platí vzťah $P = V \times I$ alebo $P = I^2 \times R$ (kde $I = V/R$).

Pohyb tlmivých roztokov závisí od hodnôt **I**, **V** a **P**. Počas elektroforézy jedna z uvedených hodnôt zostáva konštantná. Vlastnosti gélu a tlmivých roztokov sa počas elektroforézy menia, čo má za následok, že sa mení odpor gélu, a tým sa menia aj hodnoty jednosmerného elektrického prúdu (tie dve hodnoty z troch, ktoré neboli nastavené na konštantnú hodnotu). Zmeny hodnôt parametrov jednosmerného elektrického prúdu vplývajú na pohyblivosť nabitých molekúl bielkovín. Z hore uvedených vzťahov vyplýva, že ak sa počas elektroforézy bude zvyšovať odpor, zatiaľ čo napätie bude udržiavané konštantné, bude to viesť k znižovaniu hodnôt prúdu, čím dôjde k spomaleniu pohyblivosti nabitých molekúl. Zahrievanie gélu je viacej zapríčinené zmenou prúdu, ako zmenou napätia. Naopak, ak sa prúd udržiava na konštantnej hodnote, pohyblivosť nabitých molekúl sa nemení. Dôsledkom je zvýšenie odporu pri konštantnom prúde, čo sa prejaví zvýšením zahrievania gélu.

Vplyv veľkosti a tvaru molekúl je tiež evidentný, ak separačné médium (nosič) má vlastnosti molekulového sita. To je prípad škrobového gélu. Ak separované molekuly majú rovnaký náboj, ale líšia sa veľkosťou, tak potom separácie menších molekúl bude rýchlejšia. V prípade, že separované molekuly majú odlišnú veľkosť aj veľkosť nábojov, rýchlejšie sa budú pohybovať tie, ktoré budú mať väčšiu hustotu náboja (pomer náboja k jednotke hmotnosti alebo dĺžky). Vylúčiť vplyv veľkosti náboja molekúl sa dá výberom inej techniky

separácie (napr. s polyakrylamidovým gélom), kedy molekuly sú separované na základe ich molekulovej hmotnosti.

Vplyv teploty má zvlášť dôležitý význam na priebeh elektroforézy a kvalitu izozymogramov. Vzorky a všetky činidlá je nevyhnutné udržiavať v chlade. Počas elektroforézy sa tvorí teplo, ktoré musí byť eliminované zabezpečením chladu v prostredí, v ktorom prebieha elektroforéza. Nadbytočné teplo znižuje aktivitu enzýmov, preto je dôležité zabezpečiť jednotné efektívne chladenie pozdĺž celého gélového nosiča. Zvlášť dôležité je chladenie gélu, ak je hrubý (na rezanie na viacero plátov). Stredná časť hrubého gélu pravdepodobne nebude tak dobre chladená, ako budú spodná a horná časť. Interpretácia izozymogramov na teplo zvlášť citlivých enzýmov môže byť problematická z gélových plátov zo strednej časti gélu. Tento vplyv sa dá odstrániť použitím vrečka vyplneného vodou, alebo ľadom. Čiastočným nedostatkom takéhoto chladenia môže byť nerovnomerné chladenie, ktoré sa prejaví v zakrivení čela zymogramu na géle.

Priebeh elektroforézy, hlavne zabezpečenie stabilnej nízkej teploty a primeraného času na elektroforetickú separáciu je potrebné počas elektroforézy priebežne kontrolovať. Mnohé enzýmy strácajú svoju aktivitu príliš rýchlo. Ak elektroforéza trvá príliš dlho, nie sú schopné si aktivitu zachovať.

Koncentrácia proteínov vo vzorkách je významným faktorom pre ich elektroforetickú separáciu zvlášť vtedy, ak sú vzorky absorbované do knôtov, a tak vkladané do škrobového gélu. Pomer pletiva k extrakčnému činidlu by mal byť taký, aby extrakt mal kašovitú konzistenciu. Ak je potrebné, následne sa môže odstredovať a získať supernatant. Príliš zriedený supernatant nemusí obsahovať dostatočné množstvo enzýmu na katalýzu špecifickej reakcie, ktorá by viedla k vzniku farebného produktu (škvrny, pásu). V takomto prípade neprítomnosť pásu na zymograme by pravdepodobne viedla k nesprávnej interpretácii, ako nulový efekt (neprítomnosť aktivity). Pred potvrdením nulového efektu sa odporúča zopakovať analýzu. Čiastočne možno tento nedostatok korigovať rozmermi a kvalitou chromatografického papiera, z ktorého sú pripravené knôty. Koncentrácia enzýmu je proporcionálna jeho katalytickej aktivite.

Kvalita vzoriek, hlavne katalytická aktivita jednotlivých izoforiem v nej zastúpených, sú závislé od čerstvosti vzoriek a kvalitného uskladnenia. Nevhodná manipulácia so vzorkami

počas ich zberu môže viesť k redukcii až k úplnej strate aktivity enzýmov. Je potrebné minimalizovať dobu prenosu vzoriek od ich odberu po elektroforézu.

Veľkosť vzorky je dilemou pre výskumníka hlavne vtedy, ak pracuje s novým rastlinným druhom, s ktorým nemá zatiaľ experimentálne skúsenosti a nie sú uvedené ani vo vedeckej literatúre. Samotný výber rastlinného orgánu (list, koreň, celá nadzemná časť rastliny, kvet, púčik, semeno, plod ...) individuálnych rastlín, alebo uprednostnenie zmesnej vzorky zo súboru rastlín podľa účelu, ktorý má analýza splniť, môže byť problematický. Rozhodnutie je vždy na výskumníkovi zvlášť, ak ide o analýzy určenia genotypovej, resp. odrodovej identity a homogenity vzorky. Pre špeciálne účely je dostatočná veľkosť vzorky zo 100 až 500 rastlín (napr. semien).

Kvalita činidiel, ktoré sa používajú pri elektroforéze (hlavne na farbenie zón enzýmovej aktivity) je veľmi dôležitá. Treba dávať pozor na chemikálie citlivé na svetlo a teplo, musia byť uskladnené v tme, v chlade, resp. v mrazničke pri veľmi nízkych teplotách. Pri každej takejto chemikálii je dôležité akceptovať dobu aspirácie. Je veľmi účelné na balenia napísať dátum ich nadobudnutia, aby sa nezabudlo na ich životnosť. Nie je dobré sa nimi predzásobovať.

Vplyv vonkajších podmienok rastu a etapy vývinu analyzovaného biologického materiálu na aktivitu izoenzýmy je známy už niekoľko desaťročí. Na obraz polymorfizmu významne vplyvajú aj podmienky stresu tesne pred odberom vzoriek. Pre zabezpečenie exaktnosti poznania polymorfizmu, hlavne pre účely určenia rozsahu diverzity zárodočnej plazmy konkrétneho rastlinného druhu, pre účely určovania genotypovej identity a homogenity vzoriek je nevyhnutné zabezpečiť kultiváciu a odber vzoriek za štandardných (kontrolovaných) vonkajších podmienok. Pri kolísaní podmienok prostredia sú pletivá semien menej citlivé, ako sú iné časti rastlín. Počas ontogenézy sa v rastlinných pletivách, orgánoch a dokonca v celých rastlinách mení aktivita enzýmov. Možno hovoriť o dennej, sezónnej a dokonca ročnej dynamike zmien aktivity enzýmov. Pre niektoré enzýmy sa mení aj ich kvalitatívne spektrum, teda ich polymorfizmus, ako dôsledok meniacej sa regulácie činnosti génov. Z faktorov prostredia môže polymorfizmus enzýmov ovplyvniť teplota, podmienky výživy a vlastne všetky faktory prostredia, ktoré stresovo pôsobia na rast a vývin rastlín vrátane patogénov a xenobiotík (cudzorodé látky). V tejto súvislosti sa často študuje zmena polymorfizmu enzýmov ADH, CAT, DIA, PRX, SOD, EST (alkoholdehydrogenázy,

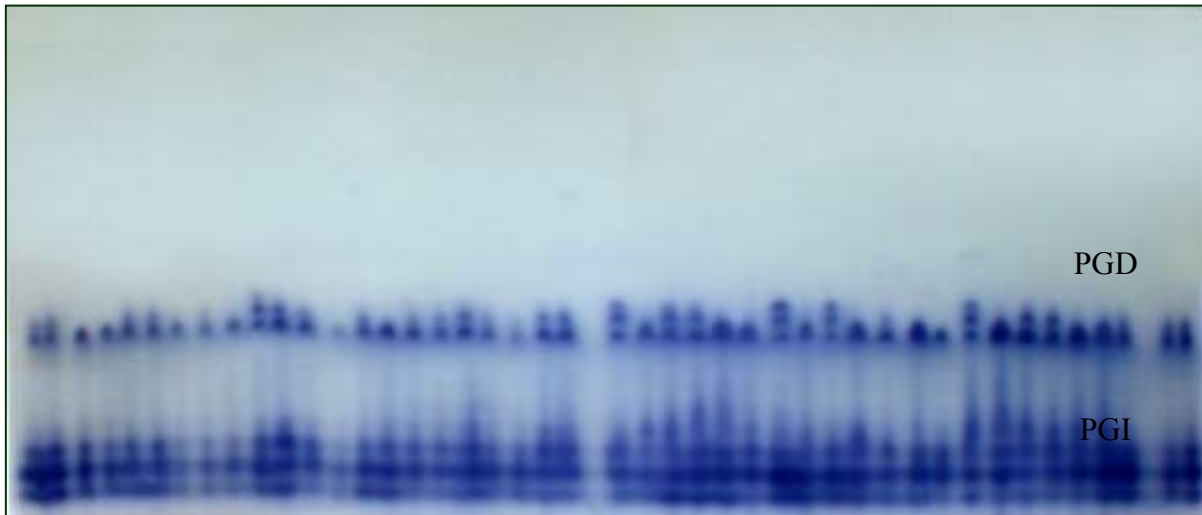
katalázy, diaforázy, peroxidázy, superoxiddizmutázy, esterázy) a i. Pri niektorých enzýmoch sa možno stretnúť s ich stabilitou zastúpenia izoformami v závislosti od veku pletiva. Sú to zvyčajne kľúčové a nezastúpiteľné enzýmy látkového a energetického metabolizmu.

Skrytá (latentná) variabilita je variabilita, ktorú nemožno detekovať danou separačnou technikou. Vlastnosti bielkovín možno zmeniť zamenou stavebných aminokyselín pomocou mutácií. Niektoré zmeny sa nedajú detekovať vzhľadom na ich povahu. Napríklad, zmena v tripletovom kóde z TTT na TTC nemá žiaden vplyv, pretože oba triplety kódujú tú istú aminokyselinu – lyzín. Podobne zmena z TCC (kyselina asparágová) na TCG (kyselina glutámová) nemení celkový náboj bielkoviny, pretože obe majú záporný náboj. Dôsledkom skrytej variability je, že odlišné formy bielkovín sa nemôžu efektívne separovať. Polymorfizmus enzýmov v populácii možno nadhodnotiť vtedy, keď dôjde k posttranslačnej modifikácii molekúl napríklad agregáciou tak, že odlišné formy možno zistiť elektroforézou i keď enzýmy sú monomorfné.

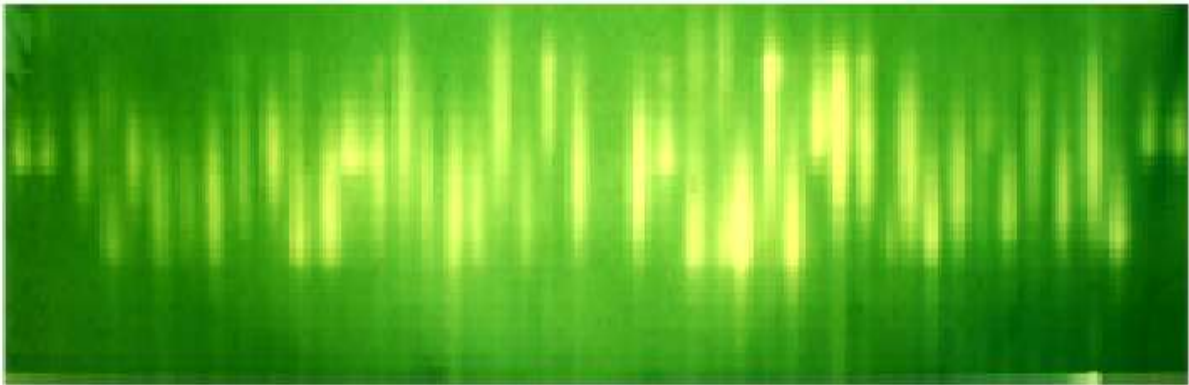
Princípy histochemického farbenia gélov. Enzýmy sú biokatalyzátory, ktoré katalyzujú metabolizmus substrátov. Niektoré sú vysoko špecifické, kým iné majú široké spektrum fyziologickej aktivity. Počas elektroforetického delenia molekuly enzýmov sa dostanú do rôznej vzdialenosti od štartu delenia. Na označenie miest, kde sa tieto molekuly vyskytujú, je potrebné dodať substrát, na ktorý pôsobením týchto molekúl vzniká farbitel'ny produkt. Produkt musí byť na géle viditeľný, aby sa dal vyhodnotiť, pretože takéto produkty nebývajú viditeľné. Na zviditeľnenie produktov sa pridávajú roztoky špeciálnych farbičiek, ktoré reagujú s produktom enzymatickej aktivity, čím sa stávajú viditeľné. Používa sa niekoľko systémov vyfarbovania. Niektoré farbiace roztoky obsahujú molekuly, ktoré sú dôležité, aby enzymatická reakcia prebehla a nazývajú sa **koenzýmami** (napr. NADP^+). Iné enzymatické reakcie vyžadujú prítomnosť molekúl anorganických alebo organických látok (napr. MgCl_2). Tieto molekuly pomocných látok vo farbiacom roztoku sa nazývajú **kofaktory**.

Vo väčšine prípadov sa prítomnosť molekúl enzýmov na škrobovom géle identifikuje ako farebné pásy alebo škvrny. Ide o **pozitívne farbenie** (Obr. 1). Interakciou farbičky a substrátu sa v niektorých prípadoch vytvorí svetlá škvrna na farebnom pozadí – **negatívne farbenie** (Obr. 2). Niekedy je vhodné na zvýraznenie pásov (škvŕn) použiť agarovú prekrývaciú vrstvu. Je to vhodné hlavne vtedy, keď koncentrácia aj aktivita enzýmu je nízka. Prekrývaciú vrstvu možno odstrániť filtračným papierom alebo celulózo-acetátovým papierom. Niektoré chemikálie na prípravu farbiacich roztokov sú drahé, preto je potrebné na vyfarbovanie

používať iba nevyhnutný objem roztoku (100, 50 alebo 10 ml). Na priebeh a rýchlosť vyfarbovania izozymogramov majú vplyv teplota substrátu, pH a iónová sila. Čas potrebný na vyfarbovanie závisí od hodnoty **Michaelisovej konštanty (K_M)** enzýmu. Niektoré zóny enzymatickej aktivity sa farbja rýchlo (napr. kataláza, v priebehu 10 minút) a niektoré aj niekoľko hodín (napr. GOT = AAT alebo GLU).



Obr. 1: Príklad pozitívneho farbenia izoenzýmov PGD a PGI z kolekoptíl kukurice siatej



Obr. 2: Príklad negatívneho farbenia izoenzýmov CAT z kolekoptíl kukurice siatej

Tlmivé roztoky farbiacich roztokov sú rozhodujúce pre kvalitu vyfarbovania škrobových gélov. V procese farbenia je **kriticky dôležité pH**. Prehľad najčastejšie používaných tlmivých roztokov a substrátov na vyfarbovanie zón enzymovej aktivity uvádzajú Vallejos (1983), Wendel a Weeden (1989) a Acquaah (1992). Príklady niektorých farbiacich roztokov sú uvedené v kapitole 4.1.9.

Stratégia rýchleho farbenia. Príprava roztokov na vyfarbovanie škrobových gélov býva často časovo náročná, hlavne pri analýze polymorfizmu väčšej skupiny enzýmov. Je preto dôležité si vedieť túto časť práce zracionalizovať tak, aby bola časovo zvládnuteľná. Na základe našich skúseností a skúseností z iných laboratórií možno využiť tieto praktické rady:

- niektoré chemikálie môžu byť predvážené a vhodne uskladnené, kým nie sú použité,
- nie je vždy nevyhnutné, aby všetky chemikálie mali veľmi presnú hmotnosť,
- veľmi presnú hmotnosť by mali mať rozhodne veľmi drahé reagenty,
- roztoky niektorých reagentov môžu byť pripravené a vhodne uskladnené vo väčších objemoch a potrebné množstvo sa len odoberá napr. pipetami,
- farbičky na svetlo citlivé a ich roztoky musia byť uskladnené v tme, alebo vo fľašiach neprepúšťajúcich svetlo a ak je potrebné, uchovávať v chlade,
- tlmivé roztoky na prípravu farbiacich roztokov možno pripraviť vopred a uchovávať až do použitia v chladničke,
- v časovom predstihu možno pripraviť roztoky presnej koncentrácie (napr. 40 jednotiek glukóza-6-fosfát dehydrogenázy $\cdot \text{ml}^{-1}$ alebo 10 mg PMS $\cdot \text{ml}^{-1}$) MTT, NBT, PMS, glukóza-6-fosfát dehydrogenázy, NADP, NAD a chloridu horečnatého,
- urýchliť prípravu roztokov možno aj predvážením si tuhých chemikálií, ale mnohí výskumníci uprednostňujú čerstvé chemikálie,
- je výhodné na opakovanú prípravu toho istého farbiaceho roztoku používať tie isté sklené a odmerné nádoby a si ich aj označiť,
- ak sa na jednom pláte dajú vyfarbiť izoenzy my dvoch druhov enzýmov, z ktorých izoformy jedného sú výrazne mobilnejšie a druhého pomalé, je možné plát prerezať cez stred na dva a farbiť individuálne,
- pred prípravou roztokov je dobré si na kartičky napísať recepty, kde sú uvedené roztoky, názvy reagentov a ich hmotnosti, čísla uzáverov fľaštičiek v ktorých sa nachádzajú (uľahčí to vyhľadávanie chemikálií),
- predvážené chemikálie a pripravené roztoky možno chladiť v nádobe s ľadom,
- skôr, ako je skompletizovaný farbiaci roztok, rezieme škrobový gél na pláty,
- najspodnejší a najvrchnejší plát gélu sa nevyfarbuje pre nevhodnú kvalitu,
- skompletizovať farbiaci roztok je potrebné pridávaním chemikálií do tlmivého roztoku v poradí, ako je uvedené v recepte a tesne pred vyfarbovaním,
- farbiaci roztok je potrebné vopred vyliať do krabice alebo boxu na vyfarbovanie, a potom do neho ponoriť plát škrobového gélu, lebo inak sa plát prilepí o dno krabice,

- narezaný škrobový plát jemne sťahujeme prstami oboch rúk a ponoríme do roztoku v krabici,
- pre rýchlejšie vyfarbenie škrobových plátov je odporúčaná ich inkubácia v uzavretých krabiciach pri vyššej teplote, ako je laboratórna,
- osvedčená je inkubácia pri 37 °C, v tme a v termostate,
- vyfarbenie zymogramov trvá pri väčšine enzýmov 30 – 60 minút a pri niektorých aj niekoľko hodín,
- ihneď, ako sa na škrobovom pláte objavia dostatočne vyfarbené izozymogramy, ukončíme vyfarbovanie, pretože ďalšie pokračovanie vo vyfarbovaní môže viesť k prefarbeniu, ktoré znemožní vyhodnotenie izozymogramov,
- je dôležité, aby farbenie škrobových plátov sa uskutočnilo ihneď po ukončení elektroforézy, a tak sa zabráni po elektroforéze nežiaducej difúzii bielkovín v géle, čo môže spôsobiť nekorektnú interpretáciu izozymogramov.

Ukončenie procesu farbenia. Pre správnu interpretáciu polymorfizmu zo zymogramu je dôležité vystihnúť ukončenie procesu farbenia. Akonáhle majú pásy na zymograme požadovanú intenzitu, možno ukončiť tento proces. Pri vyfarbovaní a vyhodnocovaní zymogramov musíme počítať s tým, že niektoré izoformy môžu strácať intenzitu sfarbenia na zymograme príliš skoro a iné sú citlivé na dlhé vyfarbovanie (veľmi silné vyfarbenie a splývanie pásov patriacich rôznym izoformám). Pri niektorých farbičkách nadbytočný čas na vyfarbovanie umožní vytvorenie jemnej vrstvičky (filmu, ktorý je komplexom farbička – škrob), ktorá sa vytvorí na géle. Film sa dá odstrániť opláchnutím povrchu škrobového gélu vodou. Vyfarbené pásy sa stanú výraznejšie. Farbenie sa ukončí odsatím farbiaceho roztoku z boxu (dvojdielna krabica) na vyfarbovanie gélu a opláchnutím gélu vodou z vodovodu. Bez ďalšieho odkladu možno škrobový gél vyhodnotiť, sfotografovať a pre dlhšie uskladnenie fixovať, resp. vysušiť a vytvoriť katalóg izozymogramov.

Bezpečnosť práce v laboratóriu je samozrejmosťou bez ohľadu na to, aký druh práce resp. chemickej analýzy sa v ňom vykonáva. Pri analýzach polymorfizmu enzýmov je potrebné brať do úvahy, že s narastajúcim počtom analyzovaných druhov enzýmov, vzrastá aj počet chemikálií, s ktorými je analytik v kontakte. Všetky chemikálie sú potenciálnym nebezpečím pre zdravie zvlášť vtedy, ak sa pracuje s holými rukami. V takom prípade je potrebné časté dokonalé umývanie rúk, lebo aj kontakt chemikálií s pokožkou môže byť nebezpečný. Zvlášť

je dôležité opatrne pracovať s chemikáliami na vyfarbovanie zymogramov (napr. MTT – tiazolyl tetrazolium bromid modrá). Za zvlášť nebezpečné sa považujú aj pre kontakt s pokožkou N-(3-aminopropyl)-morfolín a N, N-dimetylformamid. Výrobcovia často na nebezpečie upozorňujú aj certifikátom, ktorý je sprievodným dokumentom nebezpečnej chemikálie. Tak napr. Starch Art Corporation (USA) upozorňuje na nebezpečie vyplývajúce pri používaní hydrolyzovaného škrobu na prípravu škrobových gélov. Pri práci v laboratóriu je bezpodmienečne nutné nosiť ochranný odev.

- Otázky: 1. Ktorí vedci, ako prví, použili na separáciu izoenzýmov metódu elektroforézy na škrobovom géle?**
- 2. Na akých princípoch je založená elektroforetická separácia látok?**
- 3. Čo sú fingerprinty?**
- 4. Ako sa rozdeľujú separačné médiá (nosiče) v elektroforéze?**
- 5. Ktoré faktory vplývajú na elektroforetickú separáciu izoenzýmov?**
- 6. Aké riziká práce hrozia v laboratóriu pri elektroforetickej separácii a detekcii polymorfizmu enzýmov?**

4 HORIZONTÁLNA ELEKTROFORÉZA NA ŠKROBOVOM GÉLE

Počas histórie štúdia polymorfizmu enzýmov a jeho využívania v praxi najčastejšie využívanou metódou je metóda horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle, ktorú vyvinul Smithies (1955). Jej najväčšou prednosťou je, že škrobové gély sa pripravujú jednoducho a dajú sa rezať, a tak je možné v jednom gélovom systéme detekovať polymorfizmus niekoľkých druhov enzýmov na veľkom počte vzoriek. Analýzy sú rýchlejšie, šetria chemikálie a pracovnú silu, sú finančne menej náročné. Nezanedbateľnou vlastnosťou škrobových gélov je, že na rozdiel od polyakrylamidových gélov nie sú toxické.

4.1 ZARIADENIE PRE ELEKTROFORÉZU NA ŠKROBOVOM GÉLE

Vhodné zariadenie pre elektroforézu na škrobovom géle bolo publikované v mnohých publikáciách a manuáloch (Smithies 1955, Cardy *et al.* 1980, Shields *et al.* 1983, Stuber *et al.* 1988, Greneche a Giraud 1989, Soltis a Soltis 1989, Wendel a Weeden 1989, Acquah 1992, Bourgoïn-Greneche a Lallemand 1993, Bourgoïn-Greneche *et al.* 1998). Zahŕňa nosič gélu, kvety na elektródové tlmivé roztoky, akrylovú podložku na vzorky zmrazenú v ľade,

zariadenie na sériovú mechanickú (ručnú) homogenizáciu vzoriek alebo elektrický homogenizátor s inertným hrotom, chladenú odstredívku (ak je nevyhnutná), mikrovlnnú rúru alebo varič so zariadením na kontinuálne miešanie vareného škrobového gélu, vodnú vývevu, chladničku, stabilizátor elektrického prúdu, podložky a gitarovú strunu (pilku) na rezanie škrobových gélov, krabice na vyfarbovanie škrobových plátov a presvetlovací panel na jednoduchšiu identifikáciu vyfarbených pásov (škvŕn). Zariadenia z polyakrylamidu sa dajú jednoducho vyrobiť. V nasledujúcich podkapitolách budú prezentované zariadenia na elektroforézu a efektívne pracovné postupy publikované v prácach autorov Múdry a Juráček (2001) a Múdry (2002).

4.1.1 Nosič gélu a kyvety na elektródové tlmivé roztoky

V publikovaných prácach sú uvádzané nosiče gélu a kyvety na elektródové tlmivé roztoky rôznych rozmerov v závislosti od množstva jednorázovo analyzovaných vzoriek, povahy izoenzymov (pohyblivosti) a so zreteľom na šetrenie používaných chemikálií. Rozmery nosiča gélu by mali zohľadňovať určité kritériá: a) dĺžka nosiča by mala byť taká, aby umožňovala dostatočnú separáciu jasných pásov bez rizika migrácie do elektródovej kyvety, b) hĺbka kyvety závisí od počtu rezaných plátov (hĺbka 1 cm by mala postačovať) – pri hrubom géle je potrebné počítať počas elektroforézy so zahrievaním gélu, c) škrobové gély s nízkym obsahom škrobu vyžadujú zvlášť veľkú pozornosť a zručnosť pri ich manipulácii – môžu sa trhať zvlášť, ak sú veľké.

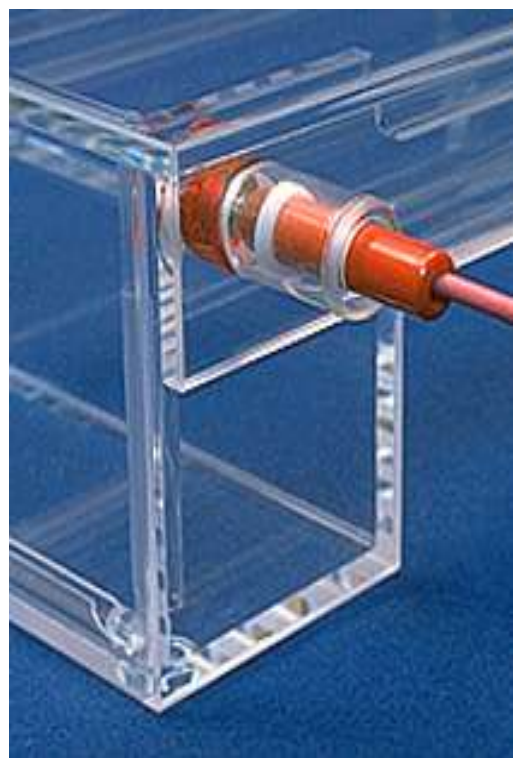
Akrylový nosič gélu je stavaný na objem 600 ml a rozmery gélu sú 22,5 x 24,5 cm. Veľkosť gélu umožňuje naraz testovať až sto vzoriek. Nosič je usporiadaný tak, aby umožňoval priamy kontakt gélu s elektródovým tlmivým roztokom (Obr. 3).

Elektroforetická aparátúra pozostáva z dvoch akrylových kyviet a zo zdroja stabilizovaného prúdu. Kyvety majú vnútorný objem 5 x 26,5 x 5 cm. V bočnej stene zvýšenej asi o 3,5 cm je zabudovaný konektor, z ktorého vedie po dĺžke kyvety platinový drôt predstavujúci elektródu (hrúbka 0,4 – 0,5 mm). Kyvety obsahujú elektródový tlmivý roztok (Obr. 4).

Nosič gélu sa položí na kyvety tak, aby oba jeho konce boli ponorené do tlmivého roztoku (Obr. 5).



Obr. 3: Nosič gélu s géloom



Obr. 4: Dve elektroforetické kyvety (anóda a katóda) umiestnené v chladničke s teplomerom na priebežnú kontrolu teploty počas elektroforézy (vľavo) a detail kladnej elektródy (vpravo)



Obr. 5 Pohľad na nosiče škrobového gélu ponorené do elektroforetických kyviet s elektródovými tlmivými roztokmi umiestnené v chladničke, konektory a pripojenie na stabilizátor jednosmerného elektrického prúdu

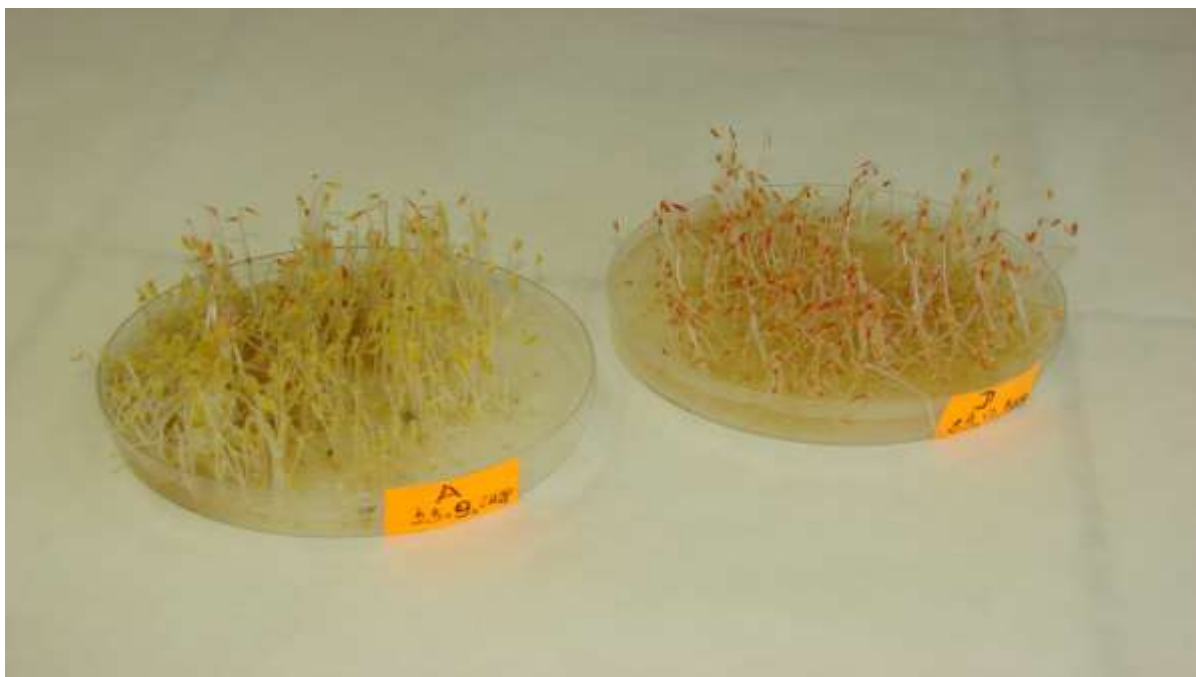
Ku kyvetám je pripojený zdroj stabilizovaného napätia (Obr. 6). Jedna kyveta predstavuje anódový priestor a druhá katódový. Ako zdroj stabilizovaného prúdu je vhodné použiť napr. programovateľný prístroj MultiDrive XL švédskej firmy Pharmacia LKB Biotechnology, ktorý umožňuje pripojenie až štyroch elektroforetických aparátúr (Obr. 6). Elektroforetická aparátúra so škrobovým gélom je umiestnená v chladničke.



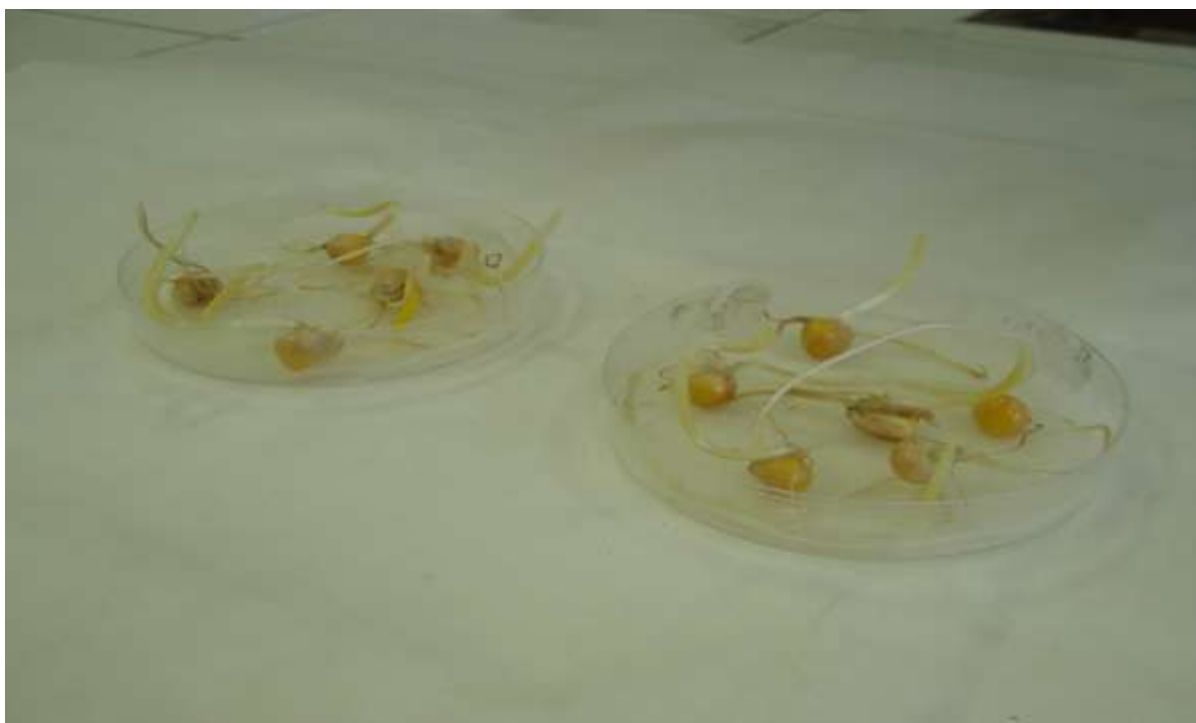
Obr. 6: Dva programovateľné zdroje jednosmerného prúdu MultiDrive XL švédskej firmy Pharmacia LKB Biotechnology

4.1.2 Príprava vzoriek na analýzu

Rastlinný materiál pre účely štúdia polymorfizmu enzýmov môže mať organizačnú úroveň subbunkovú, bunkovú, pletivovú, orgánovú, organizmovú alebo populačnú. Z tohoto pohľadu analyzované vzorky sú buď individuálne (pôvod z jedného individua) alebo zmesných vzoriek (pôvod z viacerých rastlinných jedincov). Najčastejšie analyzované bývajú extrakty z vegetatívnych častí rastliny, ako sú listové čepele, stopky listov, listy, apikálne časti koreňov alebo celé klíčiace semenáčky. Ďalej sú to časti semien – celé embryá, endosperm, napučané klíčne listy, hypokotyly, radikuly a pri trávach sú to koleoptily (Obr. 7 a 8). Nie je nič výnimočné, ak sú analyzované púčiky kvetov alebo peľ. Veľmi dôležité je, aby vybraná biologická vzorka mala vysokú aktivitu analyzovaných izoenzýmov. Potrebné je neustále mať na zreteli štandardizáciu kultivačných podmienok analyzovaných vzoriek a ich rovnaký fyziologický a ontogenetický stav.



Obr. 7: Šesťdňové klíčiace rastliny láskavca metlinatého (*Amaranthus cruentus* L.) - A a medzidruhového kríženia *A. hypochondriacus* L. x *A. hybridus* L. – B, pestované v termostate, v tme pri teplote 25 ° na prípravu zmesných vzoriek



Obr. 8: Päťdňové klíčiace rastliny kukurice siatej (*Zea mays* L.) s vyvinutými koleoptilami pre prípravu individuálnych vzoriek

4.1.3 Zloženie tlmivých roztokov pre homogenizáciu a extrakciu vzoriek

Vzhľadom na pôvod a povahu homogenizovaného rastlinného materiálu a analyzovaných enzýmov neexistuje jeden univerzálny tlmivý roztok na homogenizáciu a extrakciu vzoriek. Každý analyzovaný rastlinný druh resp. jeho orgán má svoje metodologické obtiažnosti. V prípade rastlinného materiálu to môže byť konzistencia bunkových stien, obsah vlákniny a významnú úlohu môže zohrávať prítomnosť sekundárnych metabolitov. Kvalitu separácie izoenzýmov môžu významne ovplyvniť fenolické látky, fenoloxidázy, taníny a iné. Ak tieto látky nie sú významne zastúpené vo vzorke, možno použiť jednoduché extrakčné tlmivé roztoky, ale ak sú prítomné, na zvýšenie enzymatickej aktivity extraktu a aby sa zabránilo vzniku artefaktov sa pridávajú do extrakčných tlmivých roztokov rôzne aditíva, antioxidanty, redukčné činidlá a osmotiká stabilizujúce enzýmy. Pri priekopníckych analýzach (zatiaľ vo svete nezrealizovaných) autor musí odskúšať niekoľko extrakčných činidiel a vybrať to, ktoré poskytuje najširšie spektrum polymorfizmu. Prehľad najčastejšie používaných extrakčných tlmivých roztokov uvádzajú Shields *et al.* (1983), Soltis a Soltis 1989, Wendel a Weeden (1989), Acquaah (1992). Často používané sú extrakčné činidlá:

Kukurica siata (*Zea mays* L.)

Extrakcia:

- pri 4 °C
- zhomogenizované koleoptily dlhé asi 12 mm (kultivácia zŕn na mokrom filtračnom papieri v Petriho miskách za konštantných podmienok v termostate, za tmy, 25 °C, relatívna vlhkosť vzduchu 97 %) – Stuber *et al.* (1988),
- **extrakčný tlmivý roztok: 5,0 ml H₂O, 0,84 g sacharóza, 0,42 g askorbát sodný (Stuber *et al.* 1988),**
- na jednu koleoptilu 30 µl extrakčného činidla (Stuber *et al.* 1988).

Slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.) a sója fazuľová (*Glycine max.* [L.] Merr.)

Extrakcia:

- pri 4 °C ,
- rozdrvené olúpané semeno,
- **extrakčný tlmivý roztok: 0,1 mol dm⁻³ Tris - HCl (pH= 7,2), 0,2 % β-merkaptóetanol = sulfanyletanol (v/v) - (BioGEVES 1998, Bourgoin-Greeneche a Lallemand 1993, Juráček a Múdry 1999,),**

- použiť 50 μl .

Hrach siaty (*Pisum sativum* L.)

Extrakcia:

- pri 4 °C
- zhomogenizované suché semeno (Parzysz a Przybylska 1984; Bourgoïn-Greneche a Lallemand 1993),
- **extrakčný tlmivý roztok: 10 mmol dm⁻³ Tris (pH=7,4), 25 mol dm⁻³ KCl, 0,05 mol dm⁻³ sacharóza** (Bourgoïn-Greneche a Lallemand 1993, Múdry a Juráček 1999),
- 50 μl extrakčného činidla na zhomogenizované semeno, alebo jeho časť.

Cícer baraní (*Cicer arietinum* L.) a hrachor siaty (*Lathyrus sativus* L.)

Extrakcia:

- suché semeno rozdrvené v porcelánovej miske,
- zhomogenizované semeno extrahované pri 4 °C,
- **extrakčný tlmivý roztok: 10 mmol dm⁻³ Tris (pH=7,4), 25 mmol dm⁻³ KCl, 0,05 mol dm⁻³ sacharóza** (Bourgoïn-Greneche a Lallemand 1993, Múdry *et al.* 1996, 1998),
- na jedno semeno 50 μl extrakčného činidla.

Láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.)

Extrakcia:

- pri 4 °C
- zhomogenizované suché semená, troj- alebo šesťdňové klíčence, vyvinutý list,
- **extrakčný tlmivý roztok: 5,0 ml H₂O, 0,84 g sacharóza, 0,42 g askorbát sodný** (Stuber *et al.* 1988),
- na 100 mg zhomogenizovaného listu 50 μl extrakčného činidla, alebo vyššia hmotnosť vzorky so zachovaním pomeru 1 μl : 2 mg (Múdry *et al.* 2010),
- na 200 mg troj- alebo šesťdňových klíčencov, resp. vyvinutého listu

100 μ l extrakčného činidla (Múdry a Gajdošová 2009, Múdry *et al.* 2011).

4.1.4 Homogenizácia a extrakcia vzoriek

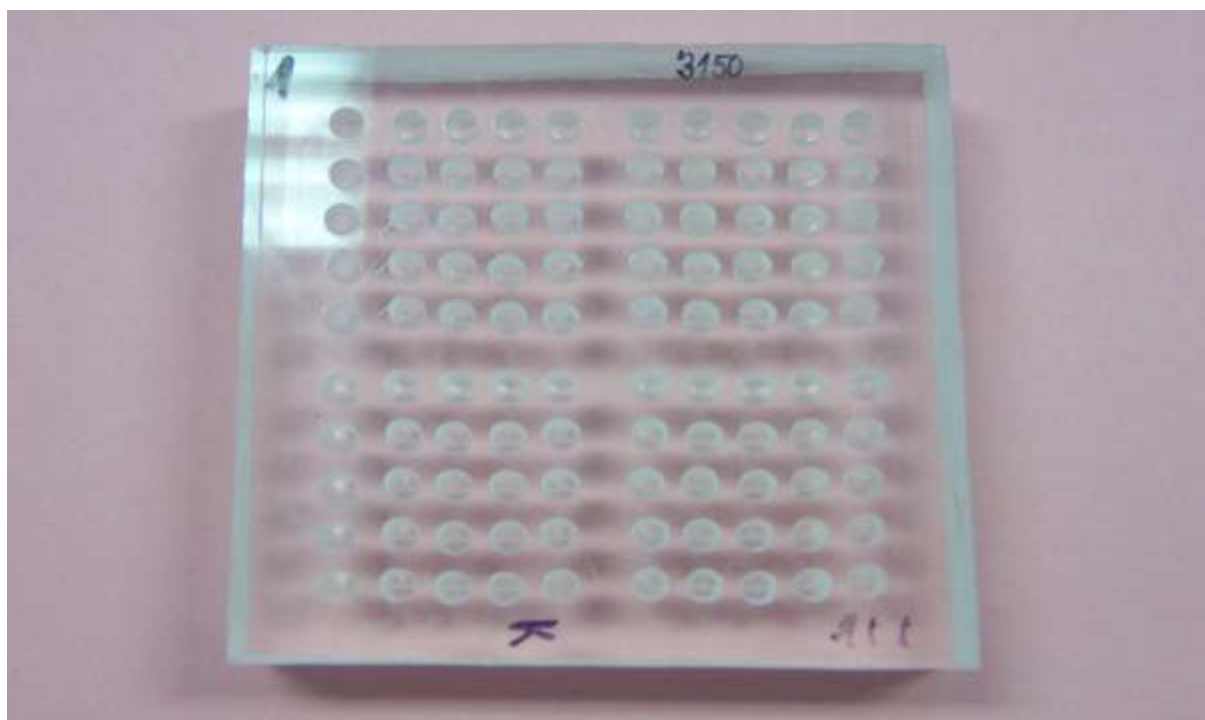
Homogenizácia a extrakcia mäkkých vzoriek sa robí ručne sklenenou tyčinkou (Obr. 9), aby bol maximálny výťažok extraktu (pozor na vzájomnú kontamináciu vzoriek používaním tej istej tyčinky bez dôkladného umytia po každom použití).



Obr. 9: Ručná homogenizácia vzoriek sklenenou tyčinkou vo fotomiske s ľadom

Pre sériové analýzy je vhodný jednoduchý typ ručného homogenizátora. Pozostáva z dvoch častí. Spodnú časť tvorí 3 cm hrubá akrylová podložka (11,5 x 11,5 cm), do ktorej je vyvŕtaných 4 x 25 otvorov s priemerom asi 0,6 cm a hĺbkou asi 1 cm. Hornú časť tvorí 25 ocelových tyčínok (priemer 0,5 cm, dĺžka asi 3 cm) vsadených do gumových objímok v akrylovom držiaku (Obr. 10 a 11). Homogenizácia vzoriek v extrakčnom roztoku sa robí mechanickým rozotieraním ocelovými tyčinkami v navŕtaných otvoroch. Vzorky obsahujúce tvrdé časti sa homogenizujú s prídavkom niekoľkých zŕn čistého piesku alebo v porcelánovej

miske s roztieračkou a následnou extrakciou. Homogenizáciu možno zrealizovať, ak je to nutné, aj laboratórnym elektrickým homogenizátorom s inertným hrotom.



Obr. 10 Akrylová podložka na homogenizáciu vzoriek



Obr. 11: Akrylová podložka a ručné zariadenie na súčasnú homogenizáciu 25-tich vzoriek

Wendel a Weeden (1989) upozorňujú, že na získanie extraktov s vysokou aktivitou enzýmov má veľký vplyv pomer analyzovaného pletiva ku objemu extrakčného činidla. Pri extrakcii vzorky uvádza tieto zásady: a) homogenizácia vzorky by mala prebiehať v minimálnom objeme extrakčného tlmivého roztoku, b) ak je nevyhnutné, rýchlo zabezpečiť odstredenie vzoriek v chladenej ultracentrifúge, c) čisté extrakty možno zmraziť, zachovávajú si aktivitu aj niekoľko mesiacov, d) všeobecne je lepšie zmrazovať a uchovávať vzorky pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ako pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a je vhodnejšie uchovávať zmrazené extrakty, ako zmrazené nezhomogenizované biologické vzorky. Všeobecne je potrebné mať na pamäti, že opakované rozmrazovanie a zmrazovanie biologického materiálu a vzoriek vedie k zhoršeniu ich kvality. Uskladňované vzorky môžu podliehať aj biochemickým zmenám, ktoré môžu simulovať polymorfizmus.

Ak literatúra neuvádza pre rastlinný druh, resp. analyzovaný biologický materiál pomer hmotnosti vzorky ku objemu extrakčného tlmivého roztoku pre efektívnu extrakciu vzorky, experimentátor si ho musí stanoviť sám. Spôsob určenia a dôležitosť pomeru hmotnosti vzorky semien, klíčencov a listových čepelí láskavca (*Amaranthus sp. L.*), rozmerov knôtov z filtračného papiera Whatman 2 a dĺžky kultivácie klíčencov sú uvedené v prácach Múdry a Gajdošová (2009) a Múdry *et al.* (2010 a 2011).

Homogenizácia vzoriek prebieha za ich neustáleho chladenia. Napr. v podložke, ktorá je vo fotomiske s ľadom. Do extraktov vzoriek sa vloží požadovaný počet papierových knôtov (každý na jeden gélový systém). Papierové knôty sú z chromatografického papiera Whatman 2 alebo 3. Rozmery knôtov môžu byť rôzne. Najčastejšie sa používajú knôty z papiera Whatman 2, ktoré majú šírku 1,5 – 2,0 mm. Nasiaknuté knôty v extraktoch v podložke možno uchovávať v mrazničke až do analýzy (len niekoľko dní).

4.1.5 Príprava škrobového gélu

Jedným z hlavných krokov pre úspešnú analýzu polymorfizmu enzýmov je príprava škrobového gélu. Škrobový gél musí byť homogénny, mal by mať požadovanú tvrdosť a pružnosť, aby sa dal dobre rezať a pre genetickú interpretáciu polymorfizmu enzýmov je dôležité, aby bol číry. Kľúčovým faktorom je samotný hydrolyzovaný zemiakový škrob, ktorý od rôznych výrobcov nemá rovnaké kvalitatívne parametre. Preto je potrebné otestovať kvalitu škrobov a vybrať si najkvalitnejší a cenovo prijateľný. Možno použiť jeden druh

škrobu alebo dva druhy, ktoré sa zmiešajú v pomere, aby pripravený gél spĺňal kvalitatívne parametre. Najčastejšie sa používajú škroby firiem: Connaught (Kanada), Otto Hiller (USA), Starch Art Corporation (USA), Fluka, Sigma, Nitin Industrial Complex (India) a i. Obsah škrobu v géle sa udáva v percentách. Najčastejšie sú publikované škrobové gély s 8, 10, 12 a 13 percentným obsahom škrobu.

Umytý a osušený nosič gélu sa opláchne roztokom Photoflo, nechá odkvapkať a vysušiť. Roztok Photoflo firmy Kodak zabraňuje prilepeniu gélu o steny a dno nosiča gélu. Jeho koncentrát sa riedi v pomere 2 ml Photoflo a 400 ml vody. Opakovane sa používa a uchováva v chladničke. Pri analýze polymorfizmu jednotlivých druhov enzýmov sa používajú rôzne druhy škrobového gélu, ktoré sa líšia použitými tlmivými roztokmi v ktorých sa varia. Dobré skúsenosti sú s gélom so zložením:

77,31 g hydrolyzovaný škrob,
15,00 g sacharóza,
600 ml gélový tlmivý roztok.

Na prípravu gélu pre kvalitnú separáciu izoenzýmov je potrebné vybrať vhodný gélový tlmivý roztok a elektródový tlmivý roztok. Aj v tomto prípade platí, že neexistuje jeden ideálny tlmivý roztok na varenie škrobu a jeden na separáciu izoforiem pre všetky druhy analyzovaných enzýmov. Je preto dôležité vybrať také tlmivé roztoky, aby analyzovaný súbor enzýmov poskytol kvalitné izozymogramy. Prehľad najčastejšie využívaných gélových a elektródových tlmivých roztokov uvádzajú Shields *et al.* (1983), Wendel a Weeden (1989) a Acquaaah (1992). Pre analýzu polymorfizmu enzýmov v koleoptilách kukurice sú používané gélové a elektródové tlmivé roztoky uvedené v Tab. 1.

Vlastná príprava gélu: v jednej varnej banke sa varí 300 ml gélového tlmivého roztoku v mikrovlnnej rúre cca. 5 min. Súčasne sa zvyšných 300 ml tlmivého roztoku naleje na navážený škrob a sacharózu a dôkladne mieša. Po piatich minútach sa škrob zaleje vriacim tlmivým roztokom a silno zamieša. Nasleduje ďalšie varenie s premiešaním, a to dvakrát po 2 minúty. Kľúčovou je otázka, ako dlho variť škrob? Rozhodne nesmie byť prevarený, pretože po vychladnutí bude tvrdý a krehký. V tomto prípade dôležitú úlohu zohráva skúsenosť.

Všeobecne možno povedať, že s varením škrobu je potrebné skončiť, keď sa objavia unikajúce malé bublinky vzduchu. Po záverečnom 1- minútovom prevarení sa banka napojí na vodnú vývevu a odsajú sa bubliny vzduchu (Obr. 12).

Odsávať rýchlo (max. 30 sekúnd), pretože škrob začne chladnúť a tuhnúť. Môžu nastať problémy s jeho kvantitatívnym vyliatím do nosiča gélu. Horúci gél sa naleje do suchej formy

Tab. 1: Zloženie elektródových a gélových tlmivých roztokov podľa použitého systému (Stuber *et al.* 1988)

Systém	Elektródový tlmivý roztok	Gélový tlmivý roztok
B pH=5,7	0,065 mol dm ⁻³ L-histidín (10,88 g/dm ³) 0,02 mol dm ⁻³ kys.citrónová (4,125 g/dm ³) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm ⁻³ L-histidín 0,003 mol dm ⁻³ kys. citrónová . . H ₂ O (1:6 roztok elektródového tlmivého roztoku)
C pH=8,3	0,19 mol dm ⁻³ kys. boritá (11,875 g/dm ⁻³) 0,04 mol dm ⁻³ hydroxid lítny (1,60 g/dm ³) pH upraviť LiOH	9 dielov Tris – kys. citrónová tlmivý roztok [0,05 mol dm ⁻³ Trizma báza (6,20 g/dm ³); 0,007 mol dm ⁻³ kys. citrónová . H ₂ O (1,50 g/dm ³)] 1 diel elektródový C tlmivý roztok
D pH=6,5	0,065 mol dm ⁻³ L-histidín (10,088 g/dm ³) 0,007 mol dm ⁻³ kys. citrónová . .H ₂ O (1,5 g/l) pH upraviť kys. Citrónovou	0,016 mol dm ⁻³ L-histidín 0,002 mol dm ⁻³ kys . citrónová . .H ₂ O (1:3 roztok tlmivého roztoku)
F pH=7,0	0,135 mol dm ⁻³ Trizma báza 0,04 mol dm ⁻³ kys. citrónová. .H ₂ O (9,0 g/ dm ³) pH upraviť kys. citrónovou	0,009 mol dm ⁻³ Trizma báza 0,003 mol dm ⁻³ kys. citrónová . .H ₂ O (1:4 elektródový tlmivý roztok zriedený)

ošetrenej roztokom Photoflo, na ktorej boli predtým zalepené okraje izolepou, aby tekutý gél nevytiekol (Obr. 13). Gél sa nechá cca. 1 hodinu chladnúť v laboratóriu. Kvôli ochrane pred dehydratáciou sa po stuhnutí prikryje fóliou a na 1 hodinu sa dá chladit' do chladničky a opäť vyberie. Potom sa nechá pri laboratórnej teplote až do analýzy v nasledujúci deň. Asi 30 minút pred vkladáním vzoriek do gélu je potrebné gél opäť chladit' v chladničke.



Obr. 12: Odsávanie vzduchu vodnou vývevou zo škrobového gélu vo varnej banke



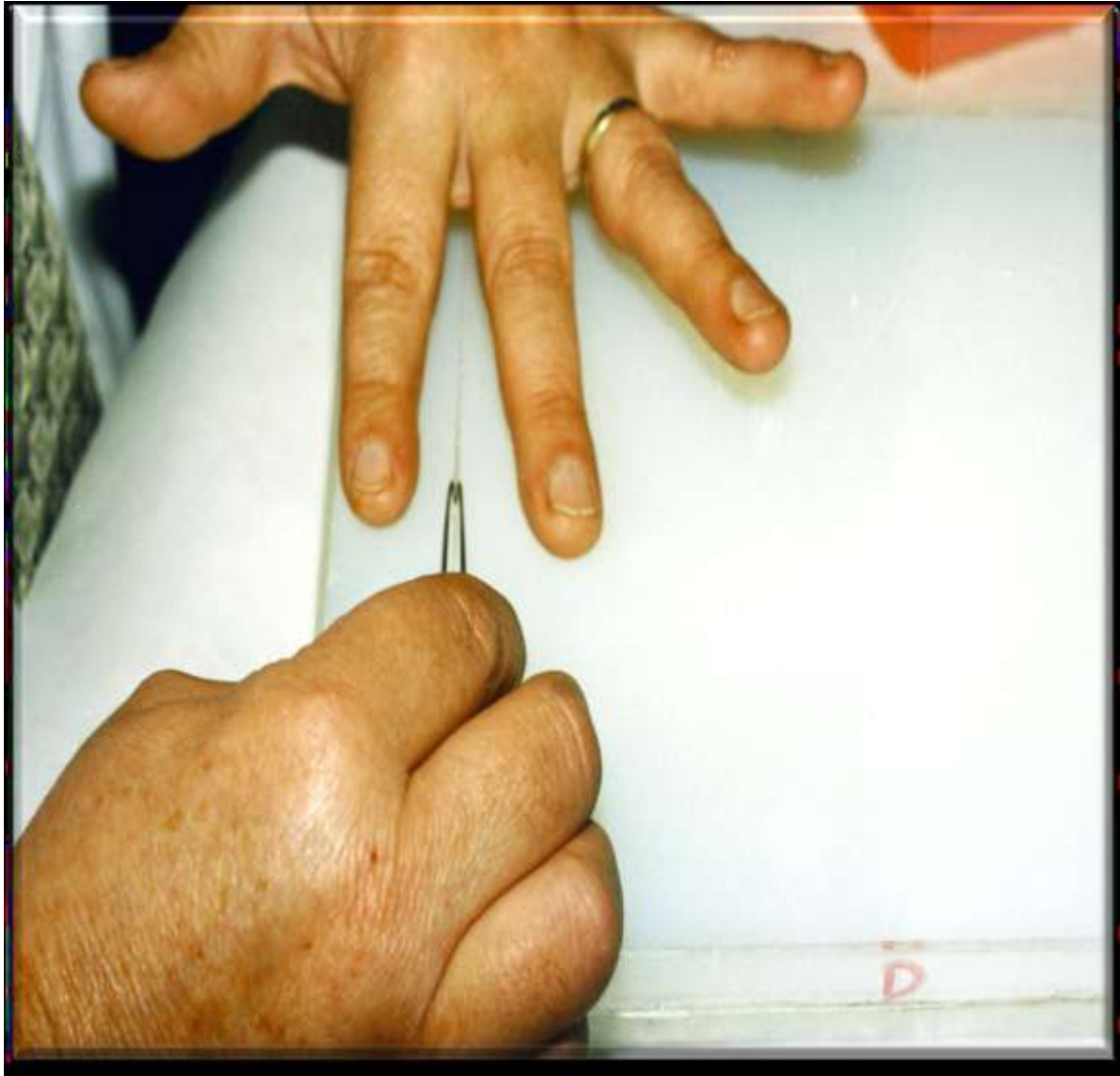
Obr. 13: Vylievanie škrobového gélu do nosiča gélu

4.1.6 Vkládanie vzoriek do gélu

Na ďalšie ráno sa stuhnutý gél dá schladiť na 30 min. do chladničky. Po schladení sa na katódovom konci urobí asi 3 cm od konca zárez po celej šírke gélu. Tento zárez slúži ako štart a ukladajú sa do neho knôty nasiaknuté extraktom vzorky (Obr. 14).

Jednotlivé knôty sa po vybratí z homogenizátora dotknú papierovej hygienickej vreckovky, aby sa odsal prebytočný extrakt a zachytili tuhé časti z extraktu. Potom sa každý knôt vkladá do zárezu vo vzdialenosti asi 2 mm od seba (minimálna vzdialenosť susedných knôtov je 1 mm). Knôty sa nesmú navzájom dotýkať, ukladajú sa kolmo a nie šikmo na gél, báza knôtu sa dotýka dna nosiča gélu a knôty po priložení ku gélu sa už nesmú premiestňovať. Asi 1 cm od bočných okrajov sa gél nechá voľný. Takto je možné umiestniť do zárezu okolo 2 x 25 knôtov. Vždy je potrebné do protokolu nakresliť schému rozmiestnenia vzoriek. Ak sú vzorky v opakovaní, je vhodná schéma, kedy sa opakovania striedajú. V takomto prípade, ak náhodou dôjde k poškodeniu časti gélu, je ešte šanca vyhodnotiť analýzu. Umiestnenie vzoriek v géle však závisí od výskumného zámeru, počtu vzoriek, opakovaní a hlavne kapacity knôtov, ktoré možno umiestniť v géle. Ak experimentátor ešte nemá skúsenosť pre pravidelné umiestnenie knôtov do gélu, môže použiť priložené pravítko. Pred prvú a za poslednú vloženú vzorku sa vložia knôty nasiaknuté roztokom farbičky (brómfenolová modrá – enzýmy so záporným nábojom, metylénová modrá – enzýmy s kladným nábojom). Postup farbičky po škrobovom géle signalizuje výskyt čela

rozpúšťadla. Po skončení vkladania knôtov sa vytlačia zo zárezu vzduchové bubliny a medzi začiatok gélu a akrylovú stenu sa vloží pás papiera kvôli utesneniu zárezu. Nakoniec sa odlepí izolepa z oboch koncov gélu. Gél je pripravený na elektroforézu.



Obr. 14: Vkladanie knôtov s extraktami do zárezu v škrobovom géle

4.1.7 Elektroforetická separácia izoenzýmov

Vlastná elektroforéza prebieha v elektroforetickej aparatúre umiestnenej v chladničke (Obr.15).



Obr. 15: Zapojenie dvoch elektroforetických aparátúr s elektroforetickou separáciou enzýmov na škrobových géloch s farbičkou (brómfenolová modrá) označujúcou čelo vyvíjania

Oba konce nosiča gélu sa uložia na elektroforetické kyvety tak, aby boli ponorené do elektródového tlmivého roztoku. Účinnosť chladenia možno zvýšiť umiestnením igelitového vrečka vyplneného vodou na povrchu gélu (nie vždy je to nevyhnutné). Sústava sa napojí na zdroj jednosmerného prúdu, pričom pohyb enzýmov prebieha od záporného pólu (štart) ku kladnému alebo od kladného pólu ku zápornému (podľa náboja separovaných izoforiem). Pre elektroforézu možno zvoliť režim konštantného výkonu, prúdu alebo napätia. Konkrétne konštantné hodnoty výkonu, prúdu alebo napätia možno zvoliť podľa analogických publikovaných prác, alebo vybrať vhodnú hodnotu na základe metodologického odskúšania (Tab 2). Na čas náročnou je samotná elektroforéza, ktorá najčastejšie trvá 3 – 8 hodín

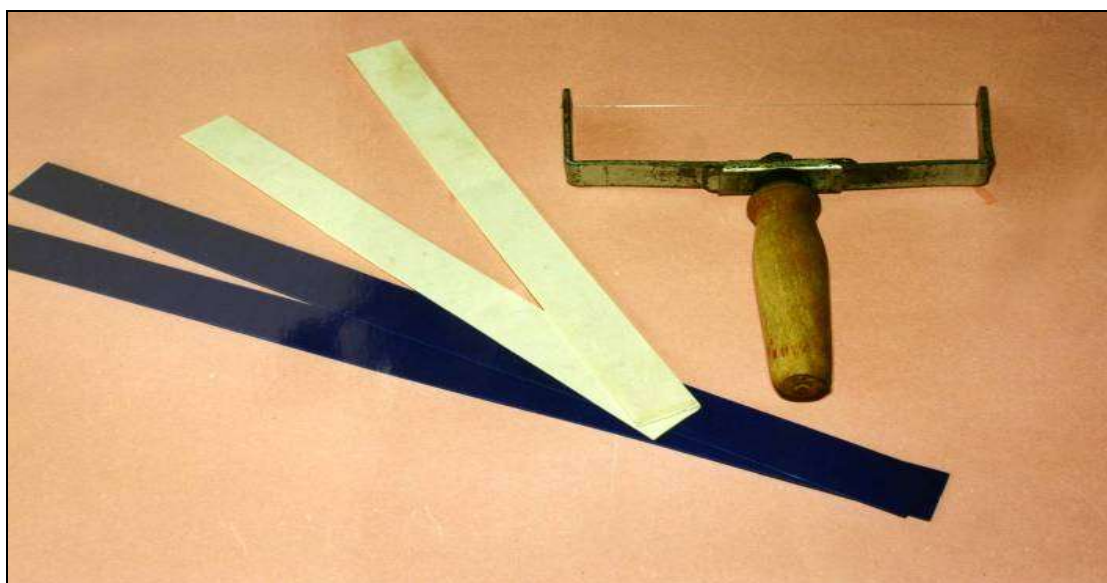
v závislosti od použitých tlmivých roztokov, hrúbky a percentuálneho obsahu škrobu v géle, počtu a hrúbky knôtov v géle a výskumníkom nastavených parametrov jednosmerného prúdu.

Tab. 2: Výkon a pracovný čas pre jednotlivé gélové systémy a enzýmy v extrakte z koleoptily kukurice siatej (Stuber *et al.* 1988)

Gélový systém	Výkon	Pracovný čas	Enzýmy
B	17,0 W	7 hodín 15 minút	MDH, ACP, GLU
C	12,0 W	6 hodín	ADH, CAT, GOT
D	16,0 W	6 hodín 30 minút	IDH, PGM, PGD, PGI
F	15,0 W	6 hodín 30 minút	DIA

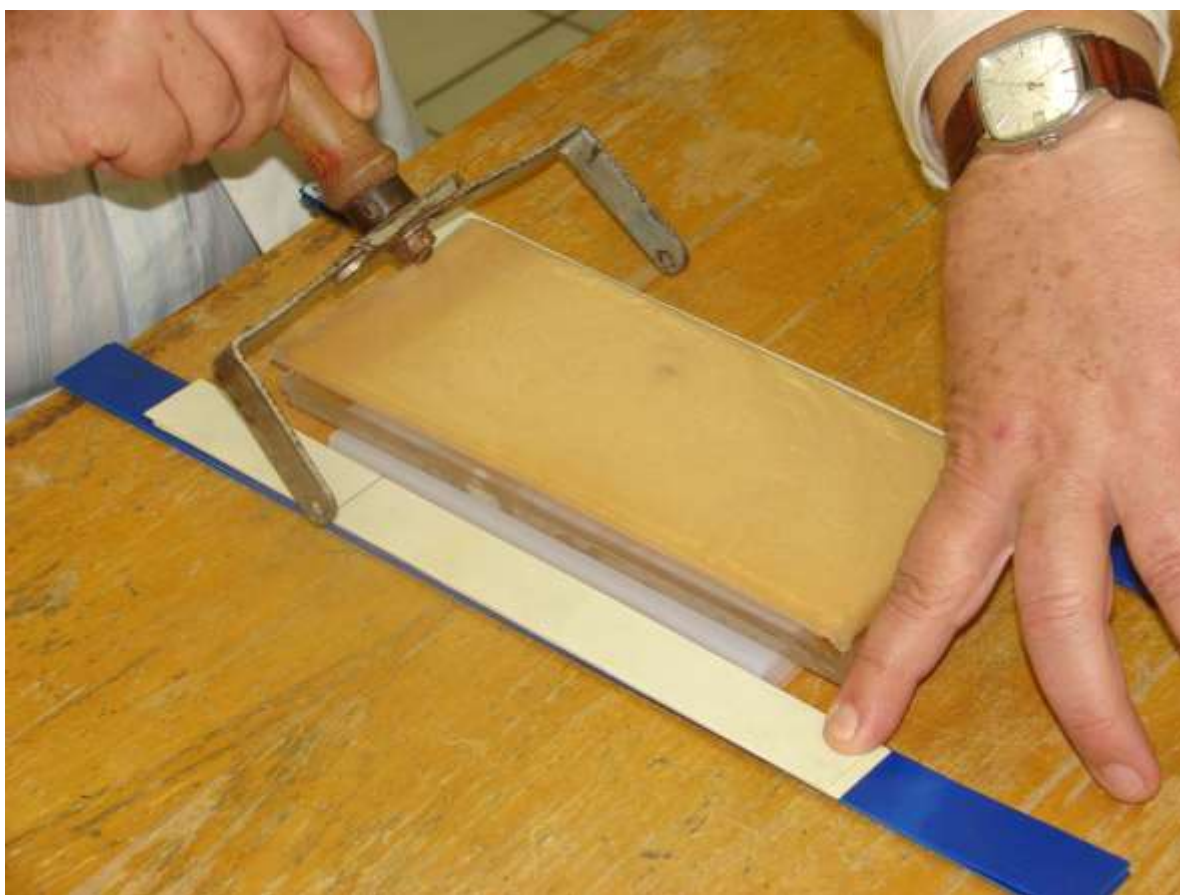
4.1.8 Technika rezania škrobových gélov na jednotlivé pláty

Gély sa režu jednoduchým zariadením, ktoré sa dá zhotoviť. Pozostáva z držiaka na ktorom je pevne napnutá gitarová struna E a z pásových podložiek hrubých asi 1,2 mm (Obr. 16). Tento spôsob rezania škrobových gélov je veľmi praktický a dodáva experimentátorovi istotu, že nezničí pri rezaní jednotlivé škrobové pláty určené na vyfarbovanie zón enzýmovej aktivity.



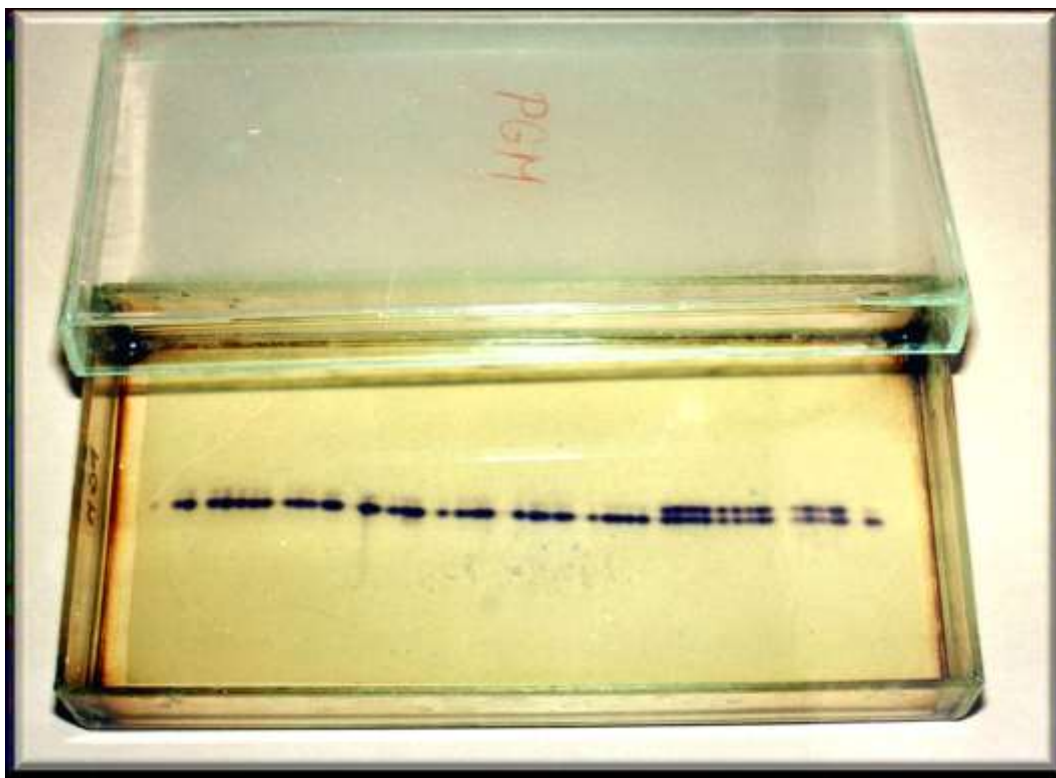
Obr. 16: Zariadenie na rezanie gélov a podložky

Po skončení elektroforézy sa gél vyberie z chladničky a jeho okraje sa orežú skalpelom. Celý gél sa prerežie priečne na dva veľké pláty. Tá časť, na ktorej sa nepredpokladá výskyt izoenzýmov sa odhodí a časť určená na analýzy sa označí, napr. v ľavom hornom rohu, trojuholníkovým zárezom. Tak sa zabráni prípadnej zámene smeru migrácie izoforiem pri manipulácii s narezanými plátmi škrobu. Odstránia sa knôty a celý plát sa položí na rovnú podložku. Tlakom ruky sa vytlačia vzduchové bubliny spod gélu a jeho povrch sa zaťaží. Po stranách gélu sa priložia podložné pásy a ťahom gitarovej struny po podložkách sa odreže asi 1,2 mm hrubá vrstva gélu (Obr. 17).



Obr. 17: Rezanie škrobového gélu na jednotlivé pláty (vrstvy)

Prikladaním ďalších podložiek možno narezať viaceré vrstvy (až 6 plátov). Takto narezané tenké pláty gélu sa umiestnia do krabíc na vyfarbovanie gélov (Obr. 18). Spodný a najvrchnejší plát sa nepoužívajú (nemajú potrebnú kvalitu na bezproblémovú interpretáciu polymorfizmu).



Obr. 18: Krabica na vyfarbovanie gélov s izozymogramami PGM na škrobovom géle

4.1.9 Princíp farbenia zón aktivity enzýmov a zloženie farbiacich roztokov

Farbenie zón enzymatickej aktivity prebieha v príslušnom systéme tlmivého roztoku za prítomnosti špecifických substrátov. Substráty sa pripravujú vopred vo forme roztokov, z ktorých sa pipetujú potrebné množstvá. Na jeden tenký plát stačí asi 50 ml farbiaceho roztoku. Prehľad najčastejšie používaných tlmivých roztokov a substrátov na vyfarbovanie zón enzymovej aktivity uvádzajú Acquah (1992), Soltis a Soltis 1989, Vallejos (1983) a Wendel a Weeden (1989). Príklady zloženia niektorých tlmivých roztokov a substrátov na vyfarbovanie zón enzymovej aktivity vybraných enzýmov v koleoptile kukurici siatej (Stuber *et al.* 1988):

ACP: 50 ml 0,1 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: octan sodný – kys. octová (pH = 5,0), 50 mg soľ Fast Garnet GBC, 50 mg MgCl₂, 50 mg sodná soľ kys. α-naftyl fosforečnej,

ADH: 50 ml 0,05 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8), 1 ml 95 % etanol, 20 mg β-nikotínamidadenín –dinukleotid, 20 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 5 mg fenazín metosulfát,

CAT: 500 mg ferikyanid draselný, 500 mg chlorid železitý, 50 ml H₂O, 0,01 % H₂O₂,

DIA: 50 ml 0,1 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=9,1), 0,5 g polyvinylpyrolidon 40, 5 mg redukovaná forma β- nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, 40 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 4 mg 2,6-dichlófenol indofenol,

GLU: Roztok 1: 50 ml 0,05 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: fosforečnan draselný (pH = 6,5), 1 g polyvinylpyrolidon 40, 100 mg soľ Fast blue BB, roztok 2: 50 mg 6-bromo-2-naftyl-β-D-glukozid v 5 ml N,N-dimetylformamid,

GOT: 50 ml substrátový roztok, 50 mg soľ Fast blue BB; substrátový roztok (pH=7,4) - 400 ml H₂O, 146,1 mg kys. α-ketoglutárová, 532,4 mg kys. L-asparágová, 2 g polyvinylpyrolidon 40, 200 mg dvojsodná soľ kys. etyléndiamín tetraoctovej, 5,68 g Na₂HPO₄,

IDH: 50 ml 0,05 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0), 50 mg MgCl₂, 150 mg trojsodná soľ kyseliny DL-izocitrónovej, 5 mg sodná soľ nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1 mg fenazín metosulfát,

MDH: 50 ml 0,1 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH = 9,1), 100 mg neutralizovaná kys. DL-jablčná, 20 mg redukovanej formy β-nikotínamidadenín - dinukleotid, 10 mg nitro blue tetrazolium,

PGD: 50 ml 0,05 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,0), 20 mg trojsodná soľ kyseliny 6-fosfoglukónovej, 50 mg MgCl₂, 5 mg sodná soľ β- nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1,5 mg fenazín metosulfát,

PGI: 50 ml 0,05 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8), 50 mg dvojsodná soľ D-fruktóza-6-fosfát, 50 mg MgCl₂, 5 mg sodná soľ β nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, 5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1,5 mg fenazín metosulfát, 10 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy,

PGM: 50 ml 0,1 mol dm⁻³ tlmivý roztok zloženia: Tris-HCl (pH=8,5), 100 mg MgCl₂, 250 mg dvojsodná soľ α-D-glukóza-1-fosfát, 10 mg sodná soľ β-nikotínamidadenín dinukleotidfosfát, 7,5 mg tetrazolium tiazolyl modrá, 1 mg fenazín metosulfát, 37,5 jednotiek NADP-závislej glukóza-6-fosfát dehydrogenázy. Po inkubácii sa gély opláchnu vodou a podľa možnosti sa ihneď (najneskoršie na druhý deň) fotografujú.

4.1.10 Fixácia, fotografovanie, fotokopírovanie a uchovávanie gélov

Samotný proces vyfarbovania škrobových gélov je veľmi dôležitý pre správne vyhodnotenie zymogramov. Nie je vhodné dlhé, ani krátke vyfarbovanie. Vyfarbovanie vo

vzťahu k polymorfizmu konkrétneho enzýmu je potrebné ukončiť vtedy, keď pásy sú najintenzívnejšie sfarbené, jasné a ohraničené. Zymogram možno zaznamenať jeho **nakreslením** na milimetrovú sieť, ktorá musí obsahovať všetky potrebné údaje vrátane dátumu a podmienok analýzy. Najpraktickejším spôsobom zaznamenania a uchovávania zymogramov je ich **fotografovanie**. Na presvetlenie škrobového gélu je vhodné použiť presvetľovací panel. Kópiu izozymogramu možno získať, ako fotokópiu na **xerovacom zariadení**.

Na dlhodobšie **uchovanie** izozymogramov na škrobových plátoch je ich potrebné vložiť do **plastových vreciek** a zaliať malým množstvom zmesi glycerol:voda (1:1) a uchovávať v chladničke. Náročnejším spôsobom uchovávania je **fixácia škrobových gélov**. Na ochranu intenzity pásov jednotlivých zymogramov, je potrebné použiť fixačné činidlá. Hlavným fixačným činidlom je roztok metanol:voda:ľadová kyselina octová v pomere 5:5:1 (Cardy a Beversdorf 1984). Gély vyfarbované za prítomnosti tetrazolium tiazolyl modrej (MTT) sa lepšie fixujú v roztoku glycerol:kyselina octová:voda:etanol v pomere 1:2:4:5 podľa Stuber *et al.* (1988).

Škrobové gély možno uchovávať aj **vysušovaním** a uzatváraním do obalov z plastickej hmoty za použitia termickej zošívачky. Treba však počítať s tým, že vysušovaním gélov môžu mnohé pásy strácať intenzitu sfarbenia.

Otázky: 1. Ktoré nevyhnutné metodologické postupy zahrňa metóda horizontálnej elektroforézy na škrobovom géle?

2. Aké spôsoby uchovávania izozymogramov poznáte?

5 ZBER ÚDAJOV A ICH ANALÝZA

V prípravnej fáze a počas samotnej elektroforetickej separácii enzýmov je vhodné robiť záznamy do **protokolu o elektroforéze**. Je to veľmi dôležité preto, lebo tieto záznamy poskytujú dôležité údaje o podmienkach za ktorých prebiehala elektroforéza. Protokol o elektroforéze poskytuje údaje o termíne konania analýz, informuje o rastlinnom druhu, orgáne a variantoch, ktoré boli analyzované, spôsobe prípravy vzoriek, schéme ich umiestnenia do gélu a podmienkach elektroforézy (viď vzor protokolu č. 1). Protokol má zabrániť zámenám vzoriek pri ich vkladaní do gélu a pomôcť pri odhalovaní chýb ktoré sa prejavajú hlavne až po ich vyfarbení. Protokol je neoceniteľný hlavne vtedy, ak sa analyzujú vzorky

PROTOKOL č.1

ANALÝZY POLYMORFIZMU ENZÝMOV LÁSKAVCOV (AMARANTHUS SP.)

Genotypy: *Amaranthus* sp. L.
Vzorky č. 9, 10, 11, 12, 13 a 14

Analyzovaný biologický materiál: - najmladší vyvinutý list pod kvitnúcim súkvetím z rastlín vypestovaných v poľných podmienkach – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany.

Podmienky a dátum homogenizácie: - vyvinutý list, extrakčné činidlo (Stuber et al. 1988), niekoľko zrníek morského piesku na uľahčenie homogenizácie. Homogenizácia – na 200 mg vzorky 100 µl extrakčného činidla.
Dátum homogenizácie vzoriek: 21.9.2010

Dátum varenia a zloženie škrobového gélu: 20.9.2010

Varenie “B“ gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Varenie “C“ gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Dátum a podmienky elektroforetickej separácie izoenzýmov: 21.9.2010

Elektroforéza “B“ gélu

				Dĺžka separácie (čas v hod.)	Vzdialenosť čela od štartu (cm)
1. začiat elektroforézy	392 /500 V	43,6/80,0 mA	17/ 17 W	3,3	PS (pravá strana gélu) = 18
koniec elektroforézy	389/500 V	43,7/80,0 mA	17/ 17 W		ĽS (ľavá strana gélu) = 19

Elektroforéza “C“ gélu

2. začiatok elektroforézy	207/500 V	57,4/80,0 mA	12/ 12 W	4,0	PS = 10,0 cm
koniec elektroforézy	301/500 V	39,9/80,0 mA	12/ 12 W		ĽS = 10,5 cm

Dátum varenia a zloženie škrobového gélu: 21.9.2010

Varenie "D" gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Varenie "F" gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Dátum a podmienky elektroforetickej separácie izoenzýmov:

<u>Elektroforéza "D" gélu</u>	Čas	Dĺžka
1. začiatok elektroforézy 427/500 V 37,6/80,0 mA 16 / 16 W	3,0	PS = 17,0
koniec elektroforézy 471/500 V 34,1/80,0 mA 16 / 16 W		LS = 19,0

Elektroforéza "F" gélu

2. začiatok elektroforézy 447/500 V 33,7/80,0 mA 15 / 15 W	3 h 10 min.	PS = 15,5
koniec elektroforézy 415/500 V 36,3/80,0 mA 15 / 15 W		LS = 17,6

Dátum varenia a zloženie škrobového gélu:

Varenie gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Varenie gélu (77,31 g Starchart + 15 g sacharóza)

Dátum a podmienky elektroforetickej separácie izoenzýmov:

<u>Elektroforéza gélu</u>	Čas	Dĺžka
1. začiatok elektroforézy /500 V /80,0 mA / W		PS =
koniec elektroforézy /500 V /80,0 mA / W		LS =
2. začiatok elektroforézy /500 V /80,0 mA / W		PS =
koniec elektroforézy /500 V /80,0 mA / W		LS =

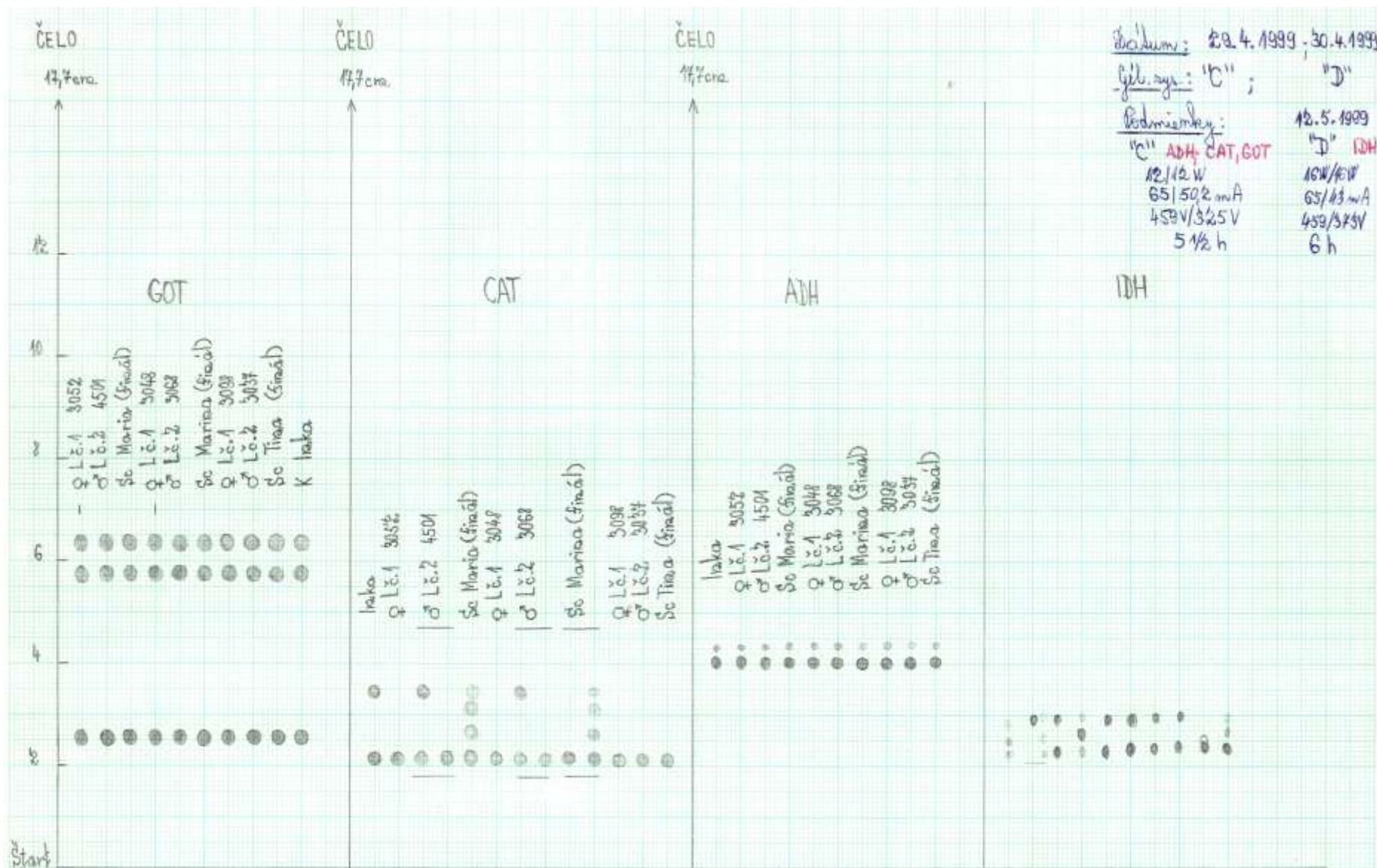
rastlinného druhu, s ktorým nie sú experimentálne skúsenosti, resp. nie je vyvinutá štandardizovaná metodológia jeho analýzy.

Okamžite, ako je škrobový gél vyfarbený, mal by byť bez odkladu vyhodnotený. Vyhodnocovanie škrobového gélu je proces získavania informácií zo zymogramov. Ako sa vyhodnocovanie realizuje, závisí od druhu požadovaných informácií.

5.1 ZÁZNAM ÚDAJOV A IZOZYMOGRAMOV (FINGERPRINTOV) NA HÁROK PAPIERA

Vyhodnocovanie, alebo “čítanie“ vyfarbených gélov možno uskutočniť bez ich vysušovania priamo v krabiciach na vyfarbovanie. Pre tento účel veľmi dobre poslúži presvetlovací pult. Vhodný je napr. typ LP 554 firmy Hama (www.hama.sk). Pult má presvetlovaciu obrazovku veľkosti 15 x 24 cm, integrovanú žiarivku a môže byť napájaný batériami alebo sieťovým adaptérom. Mnohí experimentátori pri vyhodnocovaní izozymogramov využívajú urobené záznamy týkajúce sa elektroforetickej separácie enzýmov, ktoré si urobili na hárok papiera. Je to dôležité hlavne vtedy, keď sa analyzuje veľký súbor vzoriek druhu, pri ktorom nie je ešte známa diverzita polymorfizmu enzýmov jeho zárodnej plazmy. Pre zaznamenávanie dôležitých údajov a zakresľovanie diagramov jednotlivých izozymogramov je vhodné použiť hárok papiera s milimetrovou sieťou, alebo kockovaný hárok (Obr. 19). Na hárku papiera musí byť zaznamenaná vzdialenosť kontrolnej farbičky (čelo vyvíjania, referenčný bod) od miesta nanášania vzoriek (štart) a migračné vzdialenosti jednotlivých škvŕn izozymogramov. Potom sa vypočítajú referenčné hodnoty (R_f) pre jednotlivé škvŕny izozymogramov, ako pomer ich migračnej vzdialenosti k migračnej vzdialenosti referenčného bodu (farbičky). Vypočítané hodnoty sa nazývajú **hodnoty relatívnej mobility (R_f)**.

Sú to približné hodnoty, pretože odlišné podmienky elektroforézy môžu viesť k odlišnému súboru hodnôt. Jednotlivé škvŕny na škrobovom géle sa odlišujú veľkosťou a intenzitou vyfarbenia. Tieto dôležité skutočnosti sa musia zaznamenať, i keď pri vyhodnocovaní izozymogramov sa väčší dôraz kladie na rozdiely v pohyblivosti škvŕn. Zaznamenanie rozdielov v intenzite škvŕn významne pomáha pri identifikácii heterozygotov a polyploidných druhov.



Obr. 19: Schéma izozymogramov rodičovských línií a ich dvojlíniových hybridov (Sc) kukurice siatej – Maria, Marina a Tina.

Dvojlíniový hybrid Inka je kontrolným materiálom (Múdry, 2002).

5.2 ZÁSADY INTERPRETÁCIE POLYMORFIZMU ENZÝMOV

Po úspešnej elektroforetickej separácii enzýmov a ich detekcii na škrobovom géle a po zaznamenaní podstatných údajov o jej podmienkach, priebehu a uchovaní izozymogramov, je nevyhnutnou súčasťou interpretácia polymorfizmu enzýmov. Prvým krokom je poznanie nomenklatúry enzýmov, systému a spôsobov značenia ich izoforiem. Bez tohoto kroku je prakticky nemožné kvalitné štatistické vyhodnotenie výsledkov analýz. Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov konkrétneho rastlinného druhu vychádza z poznania rozsahu diverzity polymorfizmu jeho zárodočnej plazmy, kvartérnej štruktúry enzýmov, spôsobu genetickej expresie lokusov pre polymorfizmus enzýmov, inter- a intralokusových interakcií a poznania výskytu artefaktových zón.

Po farbení a inkubácii škrobových gélov sa na géle objaví viditeľný vzor, ktorý je charakteristický (fingerprint) pre konkrétny enzým (pre ktorý bol vyfarbený) rastlinného pletiva alebo jeho časti, daného veku a etapy vývinu. Zreteľne odlišné vzory zymogramov sa v literatúre uvádzajú, ako **zymotypy**, elektroforetické varianty alebo **elektromorfy**. Tieto vzory sú **fenotypmi** im prislúchajúcich enzýmových lokusov.

Vzory polymorfizmu enzýmov sa môžu odlišovať rozdielnou pohyblivosťou jedného alebo viacerých izoenzýmov alebo chýbaním jedného alebo viacerých izoenzýmov (napr. nulové varianty). Nulové varianty sú často pod kontrolou jednotlivého génu a v heterozygotnom stave to vedie k absencii pásu (škvry) simulujúc dominantný prejav génu (Pierce a Brewbaker 1973). Nulový variant je výsledkom zmien v polypeptidovom reťazci, ktoré ovplyvňujú aktivitu enzýmu (Gorman a Kiang 1978). Skôr, ako je urobený záver z analýzy polymorfizmu enzýmov, v ktorom sa konštatuje výskyt nulovej alely, je potrebné sa dôkladne presvedčiť zopakovaním analýz. V niektorých prípadoch aktivita enzýmu môže byť tak slabá, že je za konkrétnych podmienok nedetekovateľná.

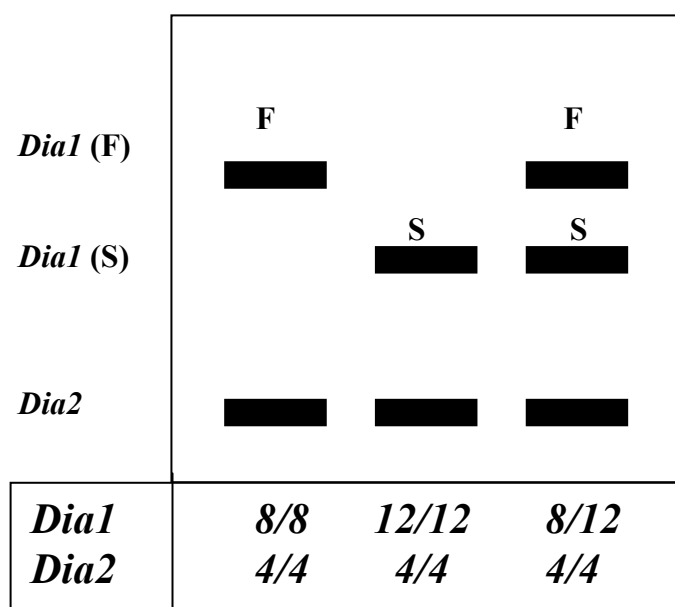
Genetickú interpretáciu izoenzýmových vzorov (izozymogramov) uľahčuje poznanie ich genetickej podmienenosti. Identifikácia izoenzýmov je nevyhnutná, pretože:

- pás alebo škvryna na zymograme nemusí nevyhnutne patriť len jednej izoforme,
- určitý izoenzým môže byť molekulárnym hybridom, ktorý je produktom dvoch alebo viacerých lokusov,
- nie často, ale niektoré proteíny môžu reagovať s tlmivými roztokmi za prejavu falošných pásov; k vzniku artefaktových pásov môže prispieť molekulová nestabilita proteínov, ktorá môže byť výsledkom toho, že vzorka je stará, alebo tým, že analýza

sa neuskutočnila dostatočne rýchlo po príprave vzorky,
 - nové pásy môžu vzniknúť aj zásahmi do metodiky (zmena tlmivých roztokov, pH atď.).

Vzory izozymogramov monoméneho enzýmu

Najjednoduchšie vzory izozymogramov tvoria enzýmy, na stavbe ktorých sa podieľa iba jeden polypeptidový reťazec. Enzýmy majú stavbu monoméru. Jedinci, ktorí majú homozygotnú stavbu lokusu pre daný enzým tvoria iba jeden pás (škvrtu) ale jedinci s heterozygotnou stavbou tvoria dva polypeptidové reťazce, a teda dva pásy. Jeden pás reprezentuje pohyblivejšiu izoformu enzýmu a často sa označuje písmenom F (fast = rýchly) a pás reprezentujúci menej pohyblivú izoformu písmenom S (slow = pomalý). Monomérený enzým heterozygotného jedinca tvorí dva pásy F a S (Obr. 20). Štruktúru monoméru majú napr. DIA a PGM kukurice siatej



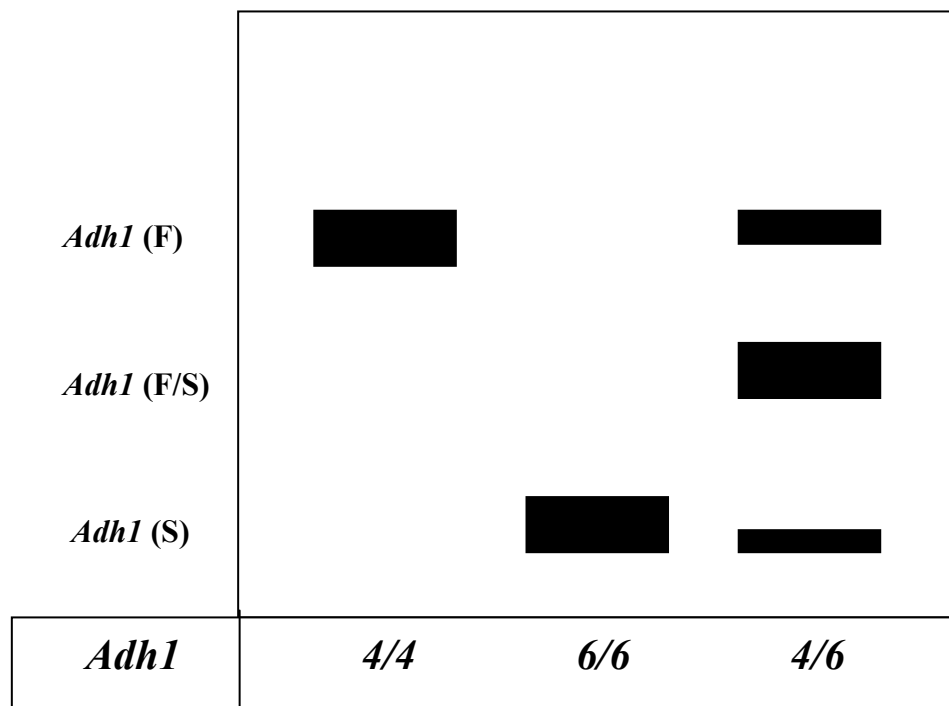
Obr. 20: Schémy izozymogramov diaforázy (DIA) kukurice siatej - Múdry (2002)

Vzory izozymogramov dimérneho enzýmu

Iné enzýmy môžu mať zložitejšiu kvartérnu štruktúru pozostávajúcu z dvoch alebo viacerých polypeptidových reťazcov. Enzým, na stavbe molekuly ktorého sa podieľajú dva

polypeptidové reťazce, sa nazývajú dimérne enzýmy alebo diméry, tri polypeptidové reťazce – triméry, štyri – tetraméry.

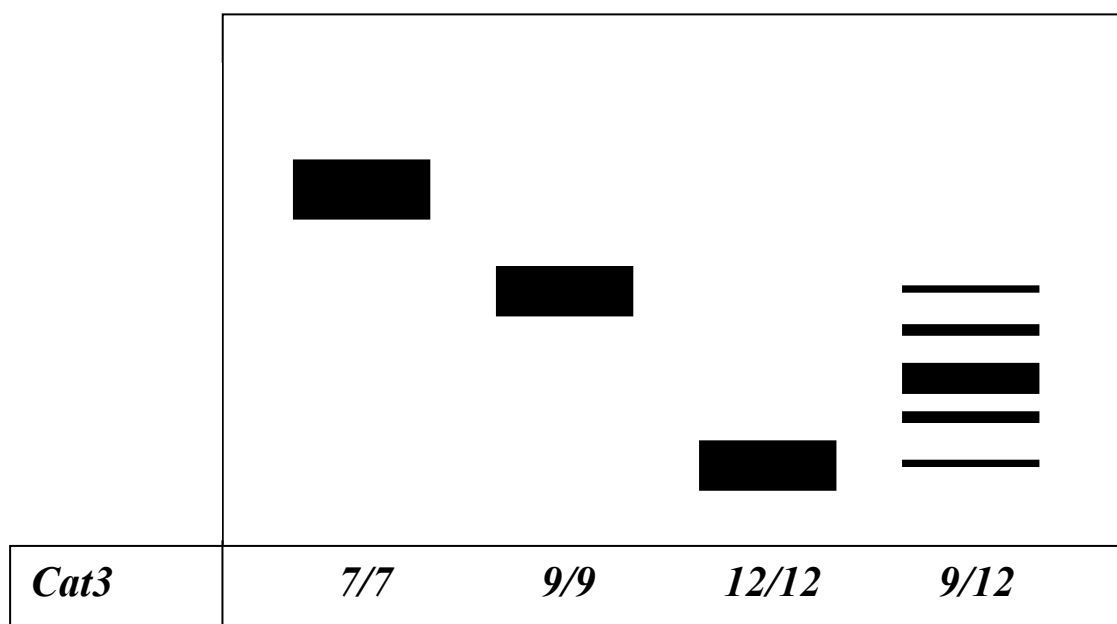
Enzým, ktorý má štruktúru diméra sa skladá z dvoch polypeptidových reťazcov, ktoré môžu mať rovnakú stavbu alebo odlišnú. Ak polypeptidové reťazce majú rovnakú stavbu, ide o enzým, syntéza ktorého je podmienená homozygotným lokusom alebo lokusom s homozygotnou konštitúciou. Ak nemajú rovnakú stavbu a polypeptidové reťazce sa odlišujú, ide o enzým, syntéza ktorého je podmienená lokusom s heterozygotnou konštitúciou. Je logické, že v prípade, keď bude mať lokus heterozygotnú konštitúciu, bude podmieňovať syntézu oboch polypeptidových reťazcov, a teda dvoch homodimérnych enzýmov, ktoré sa zobrazia na izozymograme ako dva pásy (škvrny). Pohyblivejší pás zodpovedá pohyblivejšej forme enzýmu s homomérnou stavbou (homodimér) a často sa označuje **FF** a menej pohyblivejší pás menej pohyblivému homodiméru, ktorý sa označuje **SS**. Súčasne sa však bude tvoriť aj tretí pás – heterodimér (**FS**), ktorý sa bude nachádzať uprostred vzdialenosti medzi škvrnami homodimérov FF a SS. Tento tretí pás (škvrna) sa vyfarbuje oveľa intenzívnejšie a býva aj oveľa väčší (Obr. 21). Štruktúru diméra majú napr. ADH a ACP kukurice satej.



Obr. 21: Schéma izozymogramov alkoholdehydrogenázy (ADH) kukurice satej - Múdry (2002)

Vzory izozymogramov tetramérneho enzýmu

Niektoré enzýmy majú štruktúru tetraméra, ktorú tvoria štyri polypeptidové reťazce. Nie však vždy sa tvoria všetky heterozygotné fenotypy tak, ako by sme teoreticky očakávali. Príčinou je nezlúčiteľnosť symetrií odlišných podjednotiek. Tak prítomnosť troch pásov v grame nemožno definitívne prisúdiť enzýmu, ktorý má stavbu diméra, ale že enzým má u polyméru s najmenej dvoma polypeptidovými reťazcami. Rozmazaná zóna natickej aktivity na zymograme je často znakom, že enzým je polymerický. Preto je pre nú genetickú interpretáciu zymogramov potrebné overiť genetickú identitu pásov, viť submolekulovú štruktúru enzýmu a zabezpečiť, aby porovnávané vzorky boli akého pletiva z rovnakej etapy vývinu (rovnakého veku). Zymogramy enzýmu, ktorý stavbu tetraméra sú uvedené na Obr. 22. Štruktúru tetraméra má napr. CAT kukurice satej.



22: Schémy izozymogramov katalázy (CAT) kukurice satej - Múdry (2002)

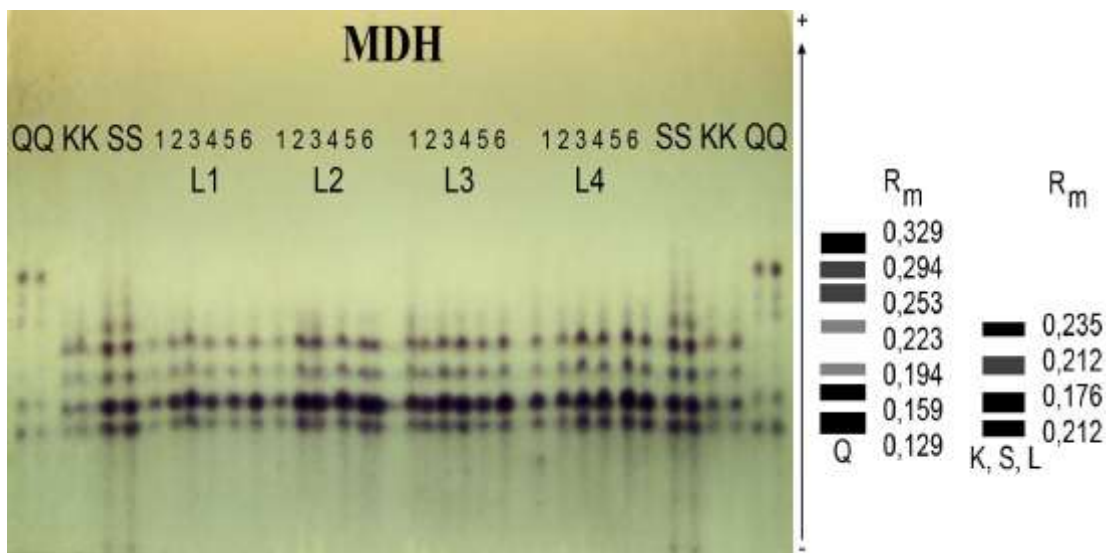
5.2.1 Nomenklatúra izoenzýmov

Pre interpretáciu výsledkov analýz polymorfizmu enzýmov je veľmi dôležité poznať spôsoby označovania enzýmov, alel a lokusov. Pre označovanie enzýmu sa namiesto často zložitého vedeckého názvu používa skratka používaného názvu enzýmu. Ako príklad možno uviesť vedecký názov podľa Medzinárodnej komisie pre biochemickú nomenklatúru enzýmu

L-aspartát: 2-oxoglutarát aminotransferáza, najčastejšie požívaný názov je glutamát oxaloacetáttransamináza, novšie používaný názov je aspartátaminotransferáza a potom skratky, ktoré sa používajú na vyjadrenie enzýmu su **GOT** a **AAT**. Pre väčšinu enzýmov sa používa jedna skratka. Pri publikovaní výsledkov je zaužívané používať okrem názvu enzýmu aj katalógové číslo enzýmu (kód enzýmu), napr. glutamát oxaloacetáttransamináza (**E.C. 2.6.1.1**).

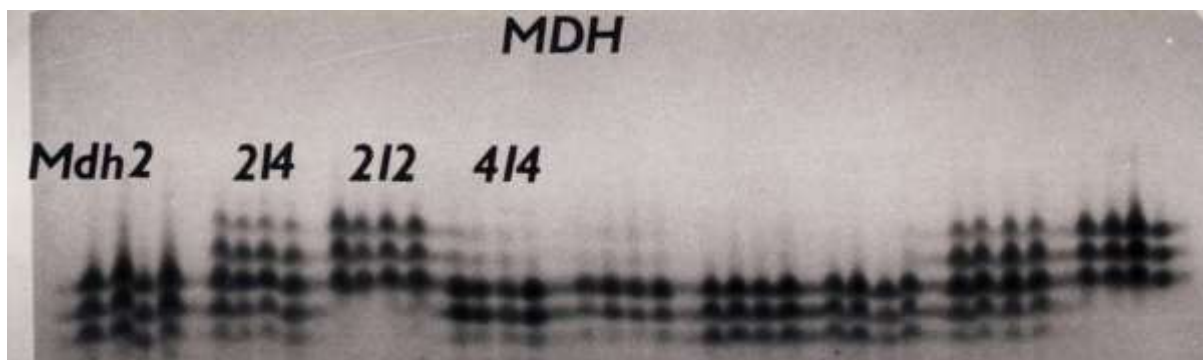
V priebehu päťdesiatročnej histórie výskumu polymorfizmu enzýmov sa objavilo niekoľko spôsobov označovania alel v lokuse. Jedným bol na základe absolutnej mobility v konkrétnych prácach, pričom číslo vyjadrovalo vzdialenosť izoformy na géle – **5**, **5.9**, **12.7** atď. Alely sa označovali aj na základe pohyblivosti ako rýchla **F (fast)** a pomalá **S (slow)**. Tento spôsob bol vhodný len v prípadoch, ak v lokuse sa vyskytovali iba dve alely. Vyjadrenie alel môže byť aj na základe mobility izoformy, ktorá sa použije ako marker. V takýchto analýzách však vždy musí byť štandardný genotyp, ktorý obsahuje konkrétnu izoformu. Ak sa vo vzorkách s veľmi vysokou frekvenciou vyskytuje spoločná alela, tak ju možno použiť ako marker. Marker bude mať hodnotu 100 mm a ostatné alely podľa aktuálnej vzdialenosti v mm od markera (90 alebo 110). Samozrejme, že veľmi častým vyjadrením je aj pomocou faktora relatívnej mobility (Obr. 23).

Pre označenie izoenzymových lokusov sa používalo tiež niekoľko spôsobov. V označení však nikdy nechýba skratka označenia enzýmu za ktorou je číslo lokusu, napr. *Acp1* (lokus kyslej fosfatázy číslo jeden). Ak má genotyp viac lokusov, tak sa analogicky označujú *Acp1*, *Acp2* atď. V prípade výskytu viacerých možných alel v jednom lokuse označujú sa malým písmenom abecedy alebo číslom – *Acp1-a*, *-b*, *-c* atď. alebo *Acp1: 1*, *2*, *3* atď. Lokus s homozygotnou konštitúciou možno vyjadriť napr. *Acp1-a/a* alebo *Acp1:1/1* a s heterozygotnou konštitúciou *Acp1-a/b*, *-a/c*, *-b/c* alebo *Acp1: 1/2*, *1/3*, *2/3* (Obr. 24) atď. Podľa určitej konvencie lokus s najnižšou numerickou hodnotou kódoval najmenej pohyblivé izoformy voči anódovému pólu, čiže najbližšie ku štartu. Na základe rozhodnutia Medzinárodnej komisie pre biochemickú nomenklatúru sa lokusy označujú na základe pohyblivosti izoformami. Lokus s najpohyblivejšími izoformami je označený 1, s menej pohyblivými 2 atď. Rovnako je to aj s označovaním alel. Alela konkrétneho lokusu najpohyblivejšia smerom k anóde bude označená a, menej pohyblivá b atď. V prípade analýz polymorfizmu enzýmov kukurice, kde je známy rozsah diverzity polymorfizmu zárodočnej plazmy tejto plodiny, sú aj alely lokusov označované číselne. Ale aj v tomto prípade najmobilnejšia alela v lokuse sa označuje 1 až na enzým malátdehydrogenáza, kde číslovanie je opačné.



Obr. 23: Izozymogramy a diagramy enzýmu malátdehydrogenáza (MDH) druhu láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.)

Vysvetlivky: **Q** - kontrolná vzorka kukurice siatej – hybrid Qvintal, **K** – vzorka 3 – dňových klíčencov láskavca metlinatého, **S** - kontrolná vzorka semien láskavca metlinatého, **L1, L2, L3, L4** - línie vzoriek listov z kultivovaných rastlín láskavca metlinatého na živnom médiu (Murashige a Skoog 1962), R_m - faktor relatívnej mobility (Múdry *et al.* 2010)



Obr. 24 Izozymogramy MDH klíčnych listov rôznych genotypov slnečnice ročnej (*Helianthus annuus* L.) - Múdry a Juráček (1998)

5.2.2 Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov (štruktúra a rozsah variability polymorfizmu, inter- a intralokusové interakcie)

Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov je najnáročnejšia časť vyhodnocovania analýz. Prevažná časť aj publikovaných prác obchádza genetickú interpretáciu výsledkov,

pretože autori nepoznajú všetky práce, ktoré k nej vedú alebo nie je predmetom ich výskumného zámeru. V takomto prípade práce dokumentujú polymorfizmus enzýmov študovaných genotypov izozymogramami alebo ich diagramami, R_m faktorom alebo označením druhu fenotypového prejavu vzorky. Ideálnou situáciou je, ak rastlinný druh je tak intenzívne študovaný, že je genetická interpretácia polymorfizmu analyzovaných enzýmov známa vrátane ich biochemickej štruktúry. Aj v takomto prípade je potrebné preštudovať všetky práce vedúce k poznaniu genetickej interpretácie. Často ide o práce publikované v priebehu posledných 40-50 rokov vedeckými kolektívami konkrétnych svetových laboratórií.

Ak je študovaný druh z pohľadu poznania genetickej interpretácie polymorfizmu enzýmov takmer neznámy, je potrebné sa zamerať na:

- a) vývoj, výber a adaptáciu vhodného metodologického postupu analýzy polymorfizmu pre analyzované vzorky,
- b) poznanie rozsahu diverzity zárodočnej plazmy analyzovaného druhu – analýza 50 – 400 odrôd v závislosti od distribúcie diverzity v súbore,
- c) v nejasných prípadoch využiť možnosti overenia genetickej analýzou krížení vhodných rodičovských genotypov,
- d) stanovenie typu fenotypového prejavu polymorfizmu (väčšinou je to kodominancia),
- e) určenie kvartérnej štruktúry enzýmu, ktorého polymorfizmus analyzujeme,
- f) určenie alebo vylúčenie prejavu jedného lokusu, dvoch alebo viacerých lokusov pri polymorfizme enzýmu,
- g) na prípadnú rozdielnu silu prejavu jednotlivých alel a na výskyt nulovej alely,
- h) výskyt artefaktových pásov vo fingerprintoch.

Polymérne alebo oligomérne enzýmy majú mnohotné štrukturálne gény kódujúce odlišné podjednotky holoenzýmu. Kombináciou týchto podjednotiek sa tvoria rôzne izoenzýmy. Izoenzýmy vznikajú náhodnou kombináciou podjednotiek a počet izoenzýmov, ktorý môže vzniknúť pri diploidnom organizme možno vypočítať podľa vzťahu:

$$i = (s + p - 1)! / [p! (s - 1)!]$$

kde i - je počet izoenzýmov (škvŕn alebo pásov na zymograme), p - je počet polymérov (ktoré sa podieľajú na stavbe polymérneho holoenzýmu) a s - je počet odlišných podjednotiek alebo variantov polymérov. Je potrebné však spomenúť, že nie vždy všetky vypočítané varianty izoenzýmov sa reálne aj v študovanom druhu syntetizujú. Určité kombinácie nie sú možné pre náboj podjednotiek, a preto sa v živých systémoch ani nevyskytujú. V mnohých prípadoch sú izozymogramy podstatne zložitejšie s väčším počtom izoforiem prítomných vo

vzorke a s komplikovanejšou interpretáciou, ako je uvedená v kap. 5.2. Hlavne ak ide o polymorfizmus za ktorý zodpovedá viac génov ako jeden pri diploidnom organizme, alebo ak ide náhodou o iný spôsob fenotypového prejavu, ako je kodominantný alebo, ak je organizmus polyploidný. V týchto prípadoch je potrebné siahnuť po vhodnej literatúre, v ktorej sú publikované príklady fingerprintov alebo ich diagramy (originály prác, katalógy fingerprintov, knižné publikácie). Z publikácií sú to napr. práce publikované autormi - Soltis a Soltis (1989) a Acquaah (1992).

Otázky: 1. Čo je to protokol o elektroforéze, čo obsahuje a aký je jeho význam?

2. Ako možno označiť izoformy enzýmu v zymograme ?

3. Na čo dôležité je potrebné sa zamerať pri genetickej interpretácii polymorfizmu enzýmov?

6 NAJČASTEJŠIE NEDOSTATKY PRI ANALÝZE POLYMORFIZMU ENZÝMOV ELEKTROFORÉZOU NA ŠKROBOVOM GÉLE

Každá z analytických techník a metodológií vedeckej práce poskytuje výsledky s určitou presnosťou, ktorá môže byť ovplyvnená viacerými objektívnymi a subjektívnymi faktormi. Podstatné však je, aby získané výsledky viedli k validným, interpretovateľným a reprodukovateľným zovšeobecňovaniám. Keďže výsledkom analýz sú izozymogramy (fingerprinty), správnosť ich interpretácie závisí od ich kvality – správne vyfarbenie, oddelené a jasné pásy izoenzýmov. Na prvý pohľad by sa mohlo zdať, že metóda analýzy polymorfizmu enzýmov horizontálnou elektroforézou na škrobovom géle je prístrojovo a metodologicky nenáročnou. Skutočnosť je však taká, že úroveň analýz je závislá od dostatočných praktických skúseností a hlavne manuálnych zručností. Problémy môžu nastať v ktorejkoľvek fáze metodológie od voľby vhodnej veľkosti analyzovanej vzorky cez tlmivé roztoky na extrakciu, pH roztokov, elektrolyty, kvalitu škrobu, zloženie škrobového gélu, parametre jednosmerného prúdu, rezanie škrobových gélov a techniku ich vyfarbovania. Nedostatky fingerprintov môžu byť spôsobené jednotlivými chybami alebo ich kumuláciou. Prehľad najčastejších chýb a ich nápravu uvádza Acquaah (1992).

6.1 CHYBY PRI PRÍPRAVE TLMIVÝCH ROZTOKOV, PRÍPRAVE VZORKY, ŠKROBOVÉHO GÉLU, SAMOTNEJ ELEKTROFORÉZE, REZANÍ A VYFARBOVANÍ ŠKROBOVÝCH GÉLOV

6.1.1 Nedostatky pri príprave tlmivých roztokov

1. **Zakalené až plesnivé** sú tlmivé roztoky znehodnotené množiacimi sa mikroorganizmami, ktorých bielkoviny by mohli viesť k vzniku artefaktov a falošných pásov na zymogramoch. Predísť tomuto javu sa dá uskladnením roztokov v chladničke, resp. prípravou nevyhnutného množstva na analýzu, prípadne na krátkodobé uskladnenie.
2. **pH tlmivého roztoku sa mení** počas uskladnenia, na čo môžu veľmi citlivo reagovať mnohé enzýmy. Je potrebné dbať, aby všetky suché reagenty použité na ich prípravu boli dokonale rozpustené a neponáhľať sa s ich prípravou. Treba čakať na jeho stabilizáciu pred jeho uskladnením.

6.1.2 Nedostatky pri príprave vzorky

1. **Zmena farby zhomogenizovanej vzorky.** Môže byť spôsobená jej oxidáciou látkami ako sú fenoly, chinóny atď. Izoenzýmy vo vzorke môžu úplne stratiť svoju aktivitu. Predísť tomuto javu možno pridaním antioxidantov a redukujúcich činidiel do extrakčného činidla (napr. kys. askorbová, 2-merkaptoetanol = 2-sulfanyletanol).
2. **Knôt nasáva extrakt pomaly,** ak homogenát je príliš hustý, alebo bolo pridaného málo extrakčného činidla. Tento nedostatok vedie k tomu, že knôt nasaje málo extraktu a horná časť knôtu zostane suchá, následkom čoho zrezaná horná vrstva škrobového gélu sa nevyfarbí pre neprítomnosť enzýmov. Ak je homogenát príliš hustý môže poskytovať do knôtu veľa proteínov, čo môže spôsobiť vytváranie nadbytočných pruhov pri vyfarbovaní škrobových vrstiev (plátov). Je potrebné presne dodržiavať pomer tlmivého roztoku ku pletivu.
3. **Knôt so vzorkou obsahuje pevké časti, resp. úlomky,** ak vzorka nebola dostatočne zhomogenizovaná. V tomto prípade sa začnú tvoriť

nadbytočné pásy nad vyfarbenými pásmi, čo je dôsledok prechodu pevných častí do škrobového gélu. Predchádzať tejto chybe sa dá centrifugáciou vzorky, alebo obrátením knôtu a jeho vložením do gélu tak, aby tuhé časti neboli v škrobovom géle.

6.1.3 Nedostatky pri príprave škrobového gélu

- 1. Hrčkovitý gél.** Škrob bol zle suspendovaný pre nedokonalé miešanie suspenzie alebo boli znečistené steny použitého skla (pred alebo po jeho varení), alebo odsávanie vzduchu z horúceho škrobového gélu trvalo dlho, a tak miestami už mohol škrobový gél tuhnúť. Chyba spôsobí nerovnomernú separáciu izoenzýmov. Preto je potrebné používať čisté sklo na prípravu gélov, dokonale premiešať škrob v tlmivom roztoku pred jeho varením, rýchlo odsat' vzduch zo škrobového gélu a nezasahovať do tuhúceho škrobového gélu.
- 2. Zakalený gél.** Nedostatočné varenie škrobového gélu. Gél nemá homogénnu konzistenciu a bude sa trhať počas rezania. Je potrebné gél variť dostatočný čas.
- 3. Gél je príliš tuhý a hustý.** Nedostatkom môže byť: a) nedostatočný podiel tlmivého roztoku alebo b) príliš dlhé odsávanie vzduchu, ktoré viedlo k ochladeniu gélu v sklenej banke v ktorej sa varil. Následkom toho a) je objem gélu menší, ako je objem nosiča gélu, čo má za následok, že sa z gélu dá narezať o jeden až dva pláty (vrstvy) menej (pretože časť gélu zostane na stenách banky) a b) koncentrácia škrobu sa zvýši v géle a spomalí sa elektroforéza. Treba urýchliť odsávanie škrobu zo škrobového gélu, vylievať škrobový gél, kým je ešte horúci a dodržiavať správny pomer škrobu a tlmivého roztoku.
- 4. Drsný povrch škrobového gélu po vychladnutí** môže byť spôsobený a) fólia na géle nebola vyrovnaná alebo natiahnutá počas nočného uchovávaní alebo b) gél bol prikrytý fóliou skôr, ako bol dostatočne vychladený a unikajúca vlhkosť kondenzovala pod fóliou, na ktorej sa utvorili kvapky, ktoré na povrch gélu vytvorili jamky. To vedie k tomu, že a) hrubší najvrchnejší plát (vrstva) sa nebude dať použiť na vyfarbenie zymogramov a b) nerovnomernému pohybu molekúl izoenzýmov (nerovnomerný tok prúdu). Je potrebné prekryvať gél fóliou, až keď je gél vychladnutý a dbať na to, aby fólia bola narovnaná na

povrchu gélu.

- 5. Počut' praskajúci zvuk pri vylievaní gélu do nosiča gélu.** Gél bol príliš horúci, a preto pukal nosič gélu. Gél pred vyliatím je potrebné nechať chvíľu vychladnúť. Ak odsávanie vzduchu z gélu bolo dostatočne dlhé, ďalšie chladenie gélu nie je potrebné.

6.1.4 Nedostatky súvisiace so samotnou elektroforézou

- 1. Na ukazovateli zdroja jednosmerného prúdu nie je žiadna hodnota.** Príčinou môže byť a) nesprávne zapojenie vodičov (káblov), b) prerušený vodič, c) nesprávny kontakt v zásuvke, d) zdroj prúdu nie je zapojený v sieti alebo v sieti nie je prúd. Výsledkom je, že elektroforéza neprebíha a bielkoviny voľne difundujú do gélu, čo sa po vyfarbení prejaví rozmazanosťou škvŕn. Vodiče zo zdroja jednosmerného prúdu je potrebné skontrolovať a správne očistiť kontakty a kontrolovať zapojenie zdroja do siete a nastavenie hodnôt na zdroji.
- 2. Farbička na označenie vzdialenosti čela vyvíjania od štartu sa pohybuje veľmi pomaly.** Ak sú zapojené na jeden zdroj jednosmerného prúdu dva škrobové gély, môže byť slabý prúd. V tomto prípade sa predĺži priebeh elektroforézy. Príčinou môže byť nesprávne pripravený gél alebo tlmivé roztoky. Odstrániť chybu možno kontrolou nastavených hodnôt prúdu na zdroji a ich korekciou alebo výmenou tlmivých roztokou (použiť čerstvo pripravené).
- 3. Napätie je príliš vysoké.** Uložené knôty v géle sú buď a) príliš tenké, b) štart na géle je roztvorený, c) tlmivé roztoky nemajú správnu iónovú silu alebo d) kontaktné plochy gélu nie sú kompletne v kontakte s elektródovými elektrolytmi. Chyba sa prejaví nerovnomernou separáciou proteínov, a teda nepresnou relatívnou mobilitou, čo vedie k slabému rozlíšeniu škvŕn, ktoré sú rozmazané. Chybu možno odstrániť po vyňatí knôtov z gélu správnym uzatvorením miesta štartu a jeho zabezpečením vložením prúžka vodu nasávajúceho papiera medzi stenu nosiča gélu a gél, ďalej hrubšieho knôtu alebo pridaním vždy dostatočného množstva elektrolytu do elektroforetických kyviel (elektrody).

- 4. Gél sa zahrieva.** Príčinou môže byť a) prúd je príliš vysoký, b) nedostatočné chladenie prostredia, kde prebieha elektroforéza, c) iónová sila tlmivých roztokov je príliš vysoká. Výsledkom tejto chyby môže byť a) ohrozenie na teplotu zvlášť veľmi citlivých enzýmov, b) narezané vrstvy gélu môžu byť krehké a môžu sa trhať pri ručnej manipulácii s nimi. Nedostatok možno odstrániť a) častou kontrolou nastavených parametrov prúdu na zdroji a prípadnou ich korekciou a b) zabezpečením dodatočného chladenia (napr. vreckom naplneným vodou alebo vyplneným kusom ľadu (hlavne vtedy, keď sa používajú tlmivé roztoky s vysokou iónovou silou).
- 5. Odporúčané napätie a prúd je ťažké alebo nemožné udržať bez rastu jednej alebo druhej hodnoty do vysokých hodnôt.** Je možné, že tlmivé roztoky nie sú presne pripravené, čo môže mať za následok, že a) gél sa príliš zahrieva a b) priebeh elektroforézy sa predĺži s rizikom, že sa zníži aktivita niektorých enzýmov. V tomto prípade je potrebné vymeniť a používať čerstvo pripravené tlmivé roztoky.
- 6. Farbička na označenie vzdialenosti čela vyvíjania sa pohybuje opačným smerom.** Príčinou môže byť opačné zapojenie elektród alebo použitie nesprávnej farbičky. Pri opačnom zapojení elektród hrozí, že vzhľadom na krátky úsek migrácie v opačnom smere sa proteíny dostanú do elektródového tlmivého roztoku. Chybe možno predísť správnym výberom farbičky a sústredením sa na správne zapojenie elektród.

6.1.5 Nedostatky pri rezaní škrobových gélov

- 1. Gél sa prilepil o dno nosiča gélu.** Môže sa to stať, ak je nosič gélu znečistený alebo bola veľmi nízka koncentrácia škrobového gélu. Hrozí zlomenie alebo dokonca zničenie gélu pri jeho vyberaní z nosiča gélu. Gél v miestach poškodenia sa zle reže a pri sťahovaní narezaných vrstiev sa trhá. V lepšom prípade sa nedá použiť len prilepená vrstva. Je potrebné sa uistiť, že nosič gélu je dokonale čistý tesne pred vyliatím horúceho gélu. Predísť prilepeniu sa gélu dá aj opláchnutím nosiča gélu s roztokom Fotoflo a jeho vysušením.
- 2. Gél sa ťažko reže.** Gél je buď a) príliš koncentrovaný vysokým

podielom škrobu, b) gél bol príliš chladený počas elektroforézy alebo c) struna na pílke na rezanie škrobových gélov je uvoľnená alebo sú na nej nalepené zvyšky gélu z predošlého rezania. Takto narezané vrstvy zo škrobového gélu budú drsné alebo zvlnené, čo zapríčiní ich horšie vyfarbovanie. Gél môže byť aj krehký a bude sa s ním horšie ručne manipulovať (môže sa trhať). Nedostatok odstránime tak, že a) znížime koncentráciu škrobu, b) použijeme kvalitnú strunu na rezanie (gitarová struna E) a nastavíme teplotu prostredia, kde prebieha elektroforéza na približne 4 °C.

3. Narezané vrstvy škrobového gélu majú drsný povrch. Pravdepodobne je znečistený povrch struny na rezanie gélov alebo struna nebola ťahaná jedným rovnomerným ťahom. Následkom toho sa môžu vytvoriť slabé škvrnky na vrstvách zo škrobového gélu a môžu sa trhať alebo sa škvrnky nerovnomerne vyfarbujú (kde je vrstva hrubšia je škvrna tmavšia a kde je tenká, tam je škvrna toho istého izoenzýmu slabá). Preto skôr, ako začneme rezať škrobový gél na vrstvy (pláty), je potrebné utrieť alebo umyť strunu na rezanie mokrou hygienickou vreckovkou.

6.1.6 Nedostatky pri vyfarbovaní škrobových gélov

1. Čelo vyvíjania je zvlnené. Príčinou môže byť to, že zárez štartu v ktorom sú vložené knôty, nie je rovný, prípadne knôty nie sú rovnomerne zatlačené alebo v záreze sú vzduchové bubliny. Chyba potom vedie k nerovnomernému vyvíjaniu zymogramov, a tak relatívne mobility sú nepresné, čo sťažuje ich interpretáciu (porovnávanie). Pre určité štúdie sa výsledky nedajú použiť. Vždy je potrebné urobiť rovný a priamy zárez na vkladanie knôtov so vzorkami. Knôty umiestniť v záreze tak, aby boli v jednej rovine, aby medzi nimi neboli vzduchové bubliny.

2. Čelo vyvíjania má kopcovitý priebeh. Je pravdepodobné, že: a) gél nemá rovnakú hrúbku, b) knôty nie sú v štarte uzatvorené paralelne alebo c) štart je na jednej strane roztvorený. Hodnotenie proteínov bude komplikované, pretože ich relatívne mobility sa budú líšiť niekoľkými milimetrami. Predísť tomuto problému sa dá tak, že nosič gélu pred vyliatím uvareného škrobu sa vždy položí na vodorovnú plochu a knôty

so vzorkami budú v škrobovom záreze uzavreté paralelne so štartom.

3. Čelo vyvíjania má tvar krivky (tzv. zymogramy s výrazom úsmevu alebo smútku). Môže to byť spôsobené tým, že: a) chladenie gélu je nerovnomerné, ak je stred chladený dodatočne, napr. blokom ľadu (v tomto prípade vznikne krivka znázorňujúca úsmev) alebo b) nedokonalé uzatvorenie štartu na začiatku a konci vedie k zníženej mobilite proteínov a vznikne tvar krivky, ktorá vyjadruje smútok. Takéto zymogramy môžu skomplikovať ich čítanie (interpretáciu). Vždy je potrebné prekryť škrobový gél fóliou z umelej hmoty, pretože chladné prostredie, kde prebieha elektroforéza, vysušuje gél, ktorý sa scvrkáva. Medzi stenu nosiča gélu a škrobový gél je potrebné vložiť prúžok papiera sajúceho vodu. Zárez v štarte zostane uzavretý počas celej elektroforézy.

4. Susediace škvrny (pásky) splynuli. Príčinu možno vidieť a) knôty so vzorkami boli umiestnené tesne k sebe, b) niektoré knôty boli umiestnené do gélu, keď už bežala elektroforéza, c) príliš veľa extraktu v knôtoch, d) elektroforéza neprebíhala dost' skoro po vložení vzoriek do škrobu alebo vyfarbovanie škrobových gélov nebolo dost' skoro po skončení elektroforézy. Vedie to k s'raženej interpretácii zymogramov, až po ich nečitateľnosť. Preto je potrebné a) správne umiestniť knôty v škrobovom géle v nevyhnutnej vzdialenosti od seba, b) používať užšie knôty s menšou kapacitou extraktu, c) odsat' prebytočné množstvo extraktu z knôtov pred ich vložením do škrobového gélu a d) knôty uložiť do škrobového gélu tak, aby boli vzpriamené.

5. Väčší počet línií je vyfarbených, ako je počet analyzovaných vzoriek.

Je to spôsobené a) reorganizáciou knôtov v škrobovom géle, ak experimentátor nepoužíva pri vkladaní knôtov plán a zistí na konci štartu, že mu vystávajú nejaké knôty a dodatočnou reorganizáciou sa ich snaží umiestniť, b) knôt s kontrolnou farbičkou môže mať tendenciu absorbovať proteíny z príľahlých knôtov (hlavne ak sú saturované extraktmi), ak je umiestnený tesne k ním alebo c) knôty neboli zbavené nadbytku extraktov, ktoré sa dostanú do priestoru susediacich knôtov a vytvoria línie príľahlých (prilahlej) vzorky. V tomto prípade to často vedie k chybnému vyhodnoteniu experimentu. Chybe sa dá vyhnúť používaním plánu nanášania vzoriek (hlavne, ak ide o začiatočníka),

b) nepohybovaním a nepremiestňovaním knôtov, ak raz už boli vložené do zárezu na štarte (zvlášť, ak boli saturované extraktom), c) výberom tenších knôtov na nasiaknutie kontrolnej farbičky a ich umiestnením dost' ďaleko od knôtov so vzorkami, d) odsatím prebytku extraktu z knôtov (napr. dotykcom knôtu hygienickej vreckovky).

6. Pásky (škvrny) sú zreteľne rozlíšené, ale tesnejšie pri sebe ako obvykle.

Príčinou je nedostatočný priebeh elektroforézy. V niektorých prípadoch to S'ťažuje interpretáciu izozymogramov. Dodržať odporúčaný priebeh elektroforézy.

7. Pásky (škvrny) sú nezreteľné a slabo oddelené. Môže to byť spôsobené

týmito príčinami: a) systém tlmivých roztokov je nevhodný pre enzým, b) pH a iónová sila tlmivého roztoku nie sú správne, c) príliš mnoho extraktu zo vzorky a d) difúzia proteínov do gélu. Nedostatky vplývajú na kvalitu vyhodnocovania, ktoré môže byť až nemožné. Odstrániť nedostatky možno: a) použitím iného systému tlmivých roztokov, b) prekontrolovaním pH tlmivých roztokov (rekalibrácia pH- metra), c) použitím menších knôtov a ich odstránením po 15-20 minútovej elektroforéze alebo d) vyskúšaním techniky prekrývajúcej vrstvy na vyfarbenom škrobovom pláte.

8. Objavenie sa pásov a čmúh medzi vyfarbenými pásmi (škvrnami).

Tento nedostatok sa prejaví, ak a) je systém tlmivých roztokov neprimeraný, b) príliš veľa extraktu v elektroforéze alebo c) nevhodný plát gélu bol použitý na vyfarbovanie. Chyby vedú ku komplikáciám pri porovnávaní a vyhodnocovaní fingerprintov. Odstránenie chýb je možné: a) zmenou systému tlmivých roztokov a kalibráciou pH- metra, b) použitím menšieho množstva extraktu zo vzorky (menšie knôty alebo odsatie prebytočného extraktu z knôtov alebo c) zmeniť poradie vyfarbovania vrstvy zo súboru narezaných škrobových vrstiev.

9. Odlišná intenzita vyfarbenia škvŕn. Príčinou môže byť a)

odlišný fyziologický stav vzoriek, manipulácia a príprava vzoriek pred elektroforézou alebo b) odlišné koncentrácie extraktov vzoriek (odlišná sacia kapacita knôtov, veľkosť knôtov). Vyhodnocovanie fingerprintov bude komplikované alebo dokonca môže viesť ku chybnjej interpretácii. Nevyhnutná je štandardizácia elektroforézy tak, aby vzorky toho istého

typu pletiva a veku boli spracované rovnakým spôsobom.

- 10. Pásky (škvvrny) sú slabé, fádne.** Fingerprinty takéhoto typu môžu vzniknúť, ak: a) bol použitý nevhodný systém tlmivých roztokov, b) nevhodné pH, c) roztok na vyfarbovanie bol nesprávne pripravený (chýba nejaký komponent), d) chemikálie na prípravu farbiacich roztokov nie sú v dobrom stave (slabá aktivita, vek), e) slabá aktivita enzýmu, f) krátky čas inkubácie. V takomto prípade škvvrny sa nedajú vyhodnotiť. Chyba sa dá odstrániť a) používaním kvalitných, čistých a aktívnych chemikálií (dodržať dobu aspirácie chemikálií a používať doporučené chemikálie doporučených výrobcov), b) sústrediť sa na kompletnosť chemikálií vo farbiacich roztokoch, c) uskladnením chemikálií v podmienkach podľa doporučenia, d) vyskúšaním iného postupu farbenia, e) predĺžením času vyfarbovania, f) použitím plátov na vyfarbovanie dvojnásobnej hrúbky.
- 11. Pásky (škvvrny) sú príliš tmavo vyfarbené.** Je to spôsobené a) príliš veľkým množstvom proteínov v extrakte použitom v elektroforéze alebo b) prefarbenie (príliš dlhá doba farbenia). V tomto prípade budú škvvrny splývať, resp. zlievať sa dohromady, čo skomplikuje vyhodnocovanie. Predísť tomu sa dá takým spôsobom, že a) sa preruší vyfarbovanie včas Alebo b) ak nie je možné okamžité vyhodnotenie, je potrebné vhodne fixovať gél.
- 12. Pozadie vyfarbeného gélu je príliš tmavé.** Túto chybu zvyčajne spôsobuje vystavovanie na svetlo citlivých farbičiek svetlu počas procesu vyfarbovania (počas prípravy farbiaceho roztoku alebo inkubácie). Za takejto situácie sa môžu stratiť slabo vyfarbené škvvrny. Inkubácia aj uskladnenie farbičiek musí byť v tme.
- 13. Roztok na vyfarbovanie počas prípravy nadobúda atypickú farbu.** Príčinou môže byť tvorba formazánu alebo nesprávne poradie (čas) pridávania jednotlivých zložiek do vyfarbovacieho roztoku. Takýto vyfarbovací roztok nebude farbiť gél správne. Je potrebné znovu overiť návod na prípravu roztoku.
- 14. Gél je prázdny (žiadne škvvrny, ktoré sa za obvyklých podmienok vyskytujú).** Príčin môže byť niekoľko: a) vo farbiacom roztoku chýba najmenej jedna zložka, b) vzorka bola znehodnotená neskorým spracovaním alebo uchovávaním, c) nevhodné podmienky pre substrát,

enzým alebo jednu zložku z farbiacich roztokov, d) nesprávna substitúcia chýbajúcej chemikálie inou (i keď dosť podobnou). Niet čo vyhodnocovať. Vyhnúť sa chybe dá: a) zodpovednejšou prípravou farbiacich roztokov, b) použitím čerstvých extraktov a chemikálií, c) skontrolovaním koenzýmov, kde sú aplikované a d) použitím odporúčaných chemikálií (koncentrácia, aktivita a množstvo) na prípravu farbiacich roztokov.

- 15. Nesprávny počet pásov (škvŕn).** Tento problém môže byť spôsobený:
- a) odlišným ontogenetickým stavom vzoriek (vek), b) odlišnými fyziologickými podmienkami pri kultivácii vzoriek, c) proteíny podliehajú zmenám kvartérnej štruktúry počas podmienok spracovania, d) artefakty farbenia (určité časti molekúl bielkovín reagujú s farbiacim roztokom). Výsledkom tejto chyby sú komplikácie pri interpretácii izozymogramov a chybné závery. Predísť tomuto javu možno:
 - a) používaním čerstvých alebo správne uskladnených vzoriek,
 - b) použitím viac ako jedného systému tlmivých roztokov na potvrdenie výsledkov a určenie izoenzýmov a c) analyzovaním vzoriek rovnakej etapy vývinu.

- Otázky:**
- 1. Ktoré nedostatky sa môžu prihodiť pri elektroforéze na škrobovom géle v súvislosti s prípravou tlmivých roztokov, prípravou vzorky a škrobových gélov?**
 - 2. Ktoré nedostatky sa môžu prejaviť v súvislosti so samotnou elektroforézou a rezaním škrobových gélov?**
 - 3. Ktoré nedostatky sa môžu prejaviť v súvislosti s vyfarbovaním škrobových gélov?**

7. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ACQUAAH, G. 1992. *Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research*. USA: Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1992, 186 s. ISBN 0-931146-22-4.

BioGEVES (1998): *Enzyme electrophoresis of sunflower*. France: Domaine du Magneraud, 17700 Surgères, France, s. 1-14.

BOURGOIN-GRENÉCHE, M. - GIRAUD, G. - POUGET, R. 1998. *Technical reference manual for the isoenzymatic analysis of maize*. France: GEVES - La Minière – F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1998, 73 s. ISBN 2-910171-28-0.

BOURGOIN - GRENECHE, M. - LALLEMAND, J. 1993: *Electrophoresis and its application to the description of varieties. A presentation of the techniques used by GEVES*. France: GEVES – La Minière - F 78285 GUYANCOURT Cedex, 1993, 63 s.

CARDY, B.J. - BEVERSDORF, W.D. 1984. Identification of soybean cultivars using isoenzyme electrophoresis. In *Seed Science and Technology*, 1984, roč. 12, č. 3, s. 943-954.

CARDY, B.J., STUBER, C.W., GOODMAN, M.M. 1980: *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (Zea mays L.)*. Institute of Statistics Mimeograph Series No. 1317, North Carolina State University, Raleigh, USA, 1980, 87 s.

GORMAN, M. B. – KIANG, Y. C. 1978. Models for the inheritance of several variant soybean electrophoretic zymograms. In *Journal of Heredity*, 1978, roč. 69, č. 4, s. 255-258.

GRENECHE, M. - GIRAUD, G. 1989. *Manuel technique de référence pour l'analyse isoenzymatique du Mais*. France: GEVES - Surgeres, 1989, 78 s.

HUNTER, R.L. - MARKERT, C.L. 1957. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. In *Science*, 1957, roč. 125, s. 1294-1295.

JERMYN, M.A. - THOMAS, R. 1954. Multiple components in horse-radish peroxidase. In: *Biochemical Journal*, 1954, roč. 56, č. 4, s. 631-639.

JURÁČEK, E. - MÚDRY, P. 1999: Metodologické postupy separácie izoenzýmov ACP, DIA, IDH, PMI, PGD, PGM a PRX druhu sója fazuľová (*Glycine max.* [L.] Merr.). In *Polnohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1999, roč. 7, č. 2, s. 26-29.

MARKERT, C.L. - MOLLER, F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patherns. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1959, roč. 45, č. 5, s. 753-763.

McMILLIN, D.E. 1983. Plant isozymes: A historical perspective. In: **TANKSLEY, S.D. - ORTON, T.J. (Eds.):** *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A: Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1983, 516 s. ISBN 0-444-42226-9.

MÚDRY, P. 2002. Analýza genetickej diverzity kukurice (záverečná správa za vecnú etapu vedecko-technického projektu). Trnava: SEMPOL Holding a. s., 2002, 92 s.

MÚDRY, P. - GAJDOŠOVÁ, A. 2009. Metodológia analýzy polymorfizmu enzýmov druhov rodu láskavec (*Amaranthus* sp. L.) pre účely genetiky, šľachtenia a semenárstva. In *Zb. zo 16. vedeckej konferencie*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby - Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2009, s. 27-30. ISBN 978-80-89417-04-09.

MÚDRY, P. - HRICOVÁ, A. - CHALÁNYOVÁ, M. 2010. Adaptácia metodologických postupov analýzy polymorfizmu enzýmov v listoch láskavca (*Amaranthus* sp. L.) pre štúdium vnútrodruhovej variability a interorgánových vzťahov. In *Zb. zo 6. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou*. Piešťany: Centrum výskumu rastlinnej výroby Piešťany - Výskumný ústav rastlinnej výroby, 2010, s. 158-159. ISBN 978-80-89417-13-1.

MÚDRY, P. - HRICOVÁ, A. - LIBIAKOVÁ, G. - GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Methodological approaches to simple enzyme polymorphism analyses of amaranth species (*Amaranthus* sp.). In *Agriculture (Polnohospodárstvo)*, 2011, roč. 57, č. 1, s. 1-11.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1998. Popis a rozlíšenie odrôd slnečnice. Metodické postupy separácie izoenzýmov ACP, GOT, MDH, ME, PGD, PGI, PGM a SKD druhu slnečnica ročná (*Helianthus annuus* L.). In *Polnohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1998, roč. 6, č. 4, s. 32-36.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 1999. Metodologické postupy separácie izoenzýmov IDH a PGD druhu hrach siaty (*Pisum sativum* L.). In *Polnohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1999, roč. 7, č. 1, s. 32-34.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. 2001. Modifikovaná štandardizovaná metodika analýzy polymorfizmu jedenástich druhov enzýmov - molekulárných značkovačov kukurice siatej (*Zea mays* L.). In *Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín*, BIOS, Nitra: SPU, 2001, s. 68-73. ISBN 80-7137-915-8, s. 68-73.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. - GÁBORČÍK, N. 1996. Metodológia separácie izoenzýmov alkoholdehydrogenázy (ADH), malátdehydrogenázy (MDH), 6-fosfoglukonátdehydrogenázy (PGD) a fosfoglukomutázy (PGM) druhu cícer baraní (*Cicer arietinum* L.). In *Polnohospodárska výroba a skúšobníctvo*, 1996, roč. 4, č. 3, s. 7-10.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, Ľ. - GÁBORČÍK, N. 1998. Polymorfism of selected isoenzymes in evaluation of identity and homogeneity of chickpea and vetchling genotypes. In: *Rostlinná Výroba*, 1998, roč. 44, č. 3, s. 103-109.

MURASHIGE, T. - SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum*, 1962, roč. 15, č. 3, s. 473-497.

NELSON, R.J. 2003. Polymorfisms. Genetics. (<http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3406500213.html>).

PARZYSZ, H. - PRZYBYLSKA, J. 1984. Isoenzyme variation in the genus *Pisum* II. Electrophoretic patterns of alcohol dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase from cotyledons of ungerminated seeds. In *Genetica Polonica*, 1984, roč. 25, č. ? , s. 255-260.

PEIRCE, L.C. – BREWBAKER, J.L. 1973. Application of isozyme analysis in horticultural science. In *Horticultural Science*, roč. 8, č. 1, s. 17-22.

SCANDALIOS, J.G. 1975. Genes, isozymes, and evolution. Isozymes. IV. In *Genetics and Evolution*, Academic Press, INC., New York – San Francisco – London, 1975, s. 1-7.

SHAW, C.R. 1964. The use of genetic variation in the analysis of isozyme structure of proteins: Biochemical and genetic aspects. In *Brookhaven Symp. Biol.*, 1964, roč. 17, s. 117-129..

SHIELDS, C.R. - ORTON, T.J. - STUBER, C.W. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In **TANKSLEY, S.D., ORTON, T.J. (Eds.). 1983.** *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 516 s. ISBN 0-444-42226-9.

SMITHIES, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. In: *Biochemical Journal*, 1955, roč. 61, č. 4, s. 629-641.

SOLTIS, D.E. - SOLTIS, P.S. 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Advances in plant Sciences Series Volume 4, Dudley, T. R. (Ed.), 1989, 269 s. ISBN 0-931146-13-5.

STUBER, C.W. - WENDEL, J.F. - GOODMAN, M.M. - SMITH, J.S.C. 1988. Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). *Technical Bulletin 286*, North Carolina, USA: North Carolina Agricultural Research Service, North Carolina State University, Raleigh, 1988, s. 1-87.

TANKSLEY, S.D. - ORTON, T.J. (Ed.). 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1983, 516 s. ISBN 0-444-42226-9.

VALLEJOS, C.E. 1983. Enzyme activity staining. In **TANKSLEY, S.D. - ORTON, T.J. (Ed.):** *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Part A, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1983, 516 s. ISBN 0-444-42226-9.

WENDEL, J.F. - WEEDEN, N.F. 1989. Visualization and interpretation of plant isoenzymes. In **SOLTIS, D.E. - SOLTIS, P.S. 1989.** *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Advances in plant Sciences Series Volume 4, Dudley, T. R. (Ed.), 1989, s. 5-45. ISBN 0-931146-13-5.

7.1 ZOZNAM RIEŠENÝCH PROJEKTOV VÝSLEDKY KTORÝCH SA PODIEĽAJÚ NA TVORBE SKRÍPT

HRICOVÁ, A. - KOL. 2008-2011. Využitie genomických a proteomických prístupov na charakterizáciu mutantných línií amarantu. Grant VEGA č. 2/0109/09.

MÚDRY, P. 1995-1998. Biochemická identifikácia, klasifikácia a katalogizácia genotypov slnečnice, sóje a hrachu na báze elektroforetickej separácie izoenzýmov. MP SR.

MÚDRY, P. 1999-2002. Úloha RVT 27-11 ochrana genofondu kultúrnych rastlín slovenska a jeho zlepšovanie progresívnymi metódami, ČÚ 05 Rozšírenie charakterizácie a využívanie genetických zdrojov rastlín, VE 02 Analýza genetickej diverzity kukurice.

MÚDRY, P. 2003-2005. Genomická klasifikácia kukurice izoenzýmovými markermi. ŠP VV, Projekt č. 2003 SP27/0280D01/0280D01 a APVT, projekt č. 20-017002.

MÚDRY, P. - JURÁČEK, I. 1990-1994. Biochemická identifikácia genotypov kukurice. N 05-529-913-01-03, MP SR.

8	OBSAH	
1	ÚVOD	5
2	POLYMORFIZMUS ENZÝMOV	6
2.1	POLYMORFIZMUS VŠEOBECNE	6
2.2	STRUČNÁ HISTÓRIA VÝSKUMU POLYMORFIZMU ENZÝMOV	7
2.3	PÔVOD IZOENZÝMOV A IZOENZÝMOVÝCH SYSTÉMOV	8
3	ELEKTROFORETICKÁ SEPARÁCIA IZOENZÝMOV	10
3.1	TYPY TECHNÍK ELEKTROFORÉZY A ZÁKLADNÉ POJMY	10
3.2	SEPARAČNÉ MÉDIÁ POUŽÍVANÉ V ELEKTROFORÉZE	11
3.3	VIZUALIZÁCIA GÉLOV	12
4	HORIZONTÁLNA ELEKTROFORÉZA NA ŠKROBOVOM GÉLE	22
4.1	ZARIADENIE PRE ELEKTROFORÉZU NA ŠKROBOVOM GÉLE	22
4.1.1	Nosič gélu a kvety na elektródové tlmivé roztoky	23
4.1.2	Príprava vzoriek na analýzu	26
4.1.3	Zloženie tlmivých roztokov pre homogenizáciu a extrakciu vzoriek	28
4.1.4	Homogenizácia a extrakcia vzoriek	30
4.1.5	Príprava škrobového gélu	32
4.1.6	Vkladanie vzoriek do gélu	35
4.1.7	Elektroforetická separácia izoenzýmov	36
4.1.8	Technika rezania škrobových gélov na jednotlivé pláty	38
4.1.9	Princíp farbenia zón aktivity enzýmov a zloženie farbiacich roztokov	40
4.1.10	Fixácia, fotografovanie, fotokopírovanie a uchovávanie gélov	41
5	ZBER ÚDAJOV A ICH ANALÝZA	42
5.1	ZÁZNAM ÚDAJOV A IZOZYMOGRAMOV (FINGERPRINTOV) NA HÁROK PAPIERA	45
5.2	ZÁSADY INTERPRETÁCIE POLYMORFIZMU ENZÝMOV	47
5.2.1	Nomenklatúra izoenzýmov	50
5.2.2	Genetická interpretácia polymorfizmu enzýmov (štruktúra a rozsah variability polymorfizmu, inter- a intralokusové interakcie	52
6	NAJČASTEJŠIE NEDOSTATKY PRI ANALÝZE POLYMORFIZMU ENZÝMOV ELEKTROFORÉZOU NA ŠKROBOVOM GÉLE	54

6.1	CHYBY PRI PRÍPRAVE TLMIVÝCH ROZTOKOV, PRÍPRAVE VZORKY, ŠKROBOVÉHO GÉLU, PRI SAMOTNEJ ELEKTROFORÉZE, REZANÍ A VYFARBOVANÍ ŠKROBOVÝCH GÉLOV	55
6.1.1	Nedostatky pri príprave tlmivých roztokov	55
6.1.2	Nedostatky pri príprave vzorky	55
6.1.3	Nedostatky pri príprave škrobového gélu	56
6.1.4	Nedostatky súvisiace so samotnou elektroforézou	57
6.1.5	Nedostatky pri rezaní škrobových gélov	58
6.1.6	Nedostatky pri vyfarbovaní škrobových gélov	59
7.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	64
7.1	ZOZNAM RIEŠENÝCH PROJEKTOV VÝSLEDKY, KTORÝCH SA PODIEĽAJÚ NA TVORBE SKRÍPT	68
8.	OBSAH	69

© RNDr. Pavol Múdry, CSc., 2011

Recenzenti: prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Za odbornú, jazykovú a štylistickú stránku týchto vysokoškolských skrípt zodpovedá autor.
Schválené vedením Pedagogickej fakulty Trnavskej univerzity dňa 2011 ako skriptá pre
Pedagogickú fakultu TU.

ISBN 978-80-8082-502-7