



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

**Využití gelové a čipové elektroforézy k identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice**

Bradová, Jana; Dvořáček, Václav; Štočková, Lenka  
2011

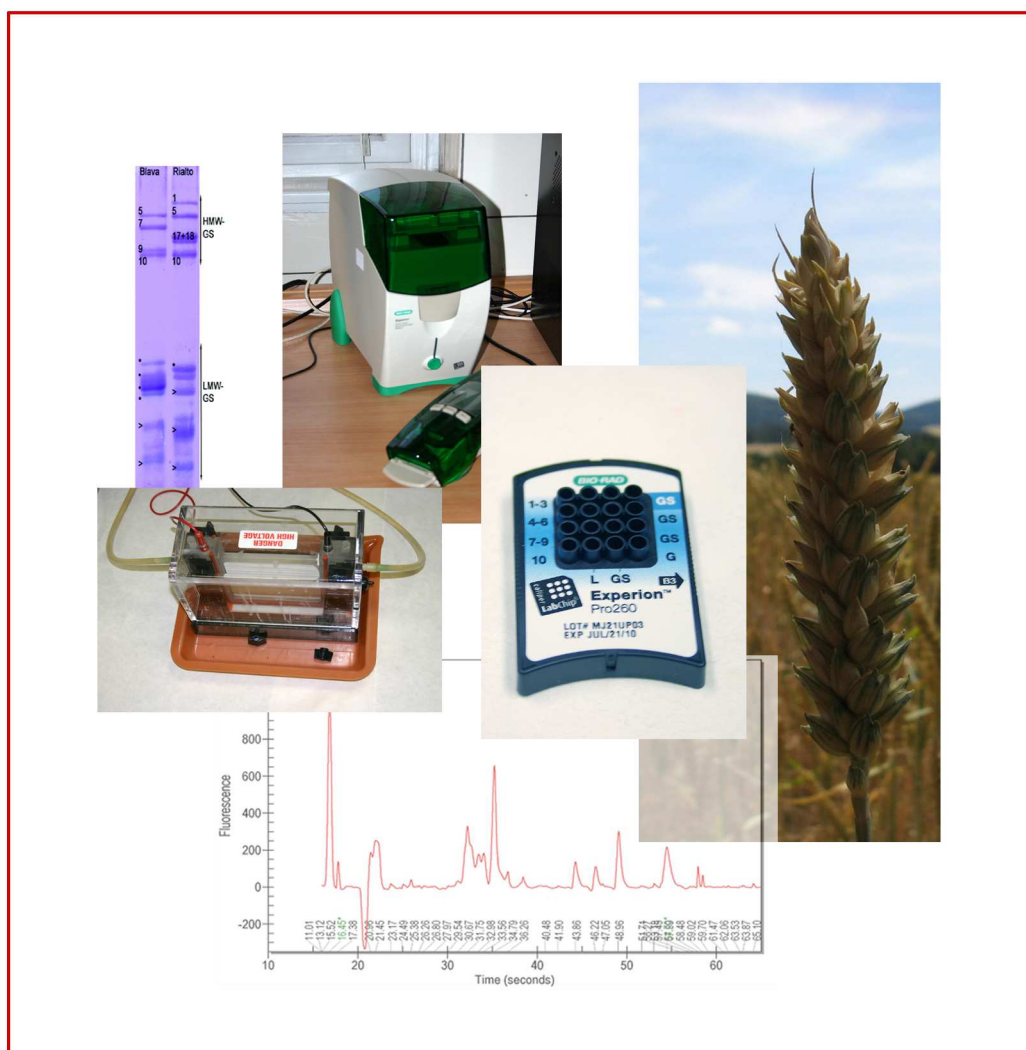
Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-112568>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

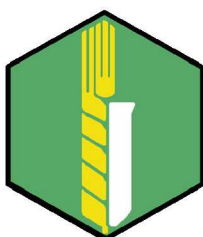
Datum stažení: 27.09.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://nusl.cz).



# Využití gelové a čipové elektroforézy k identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice

Jana Bradová, Václav Dvořáček, Lenka Štočková



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
2011

Metodika vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výstupem řešení projektu NAZV QH92155 „**Využití biodiverzity zásobních proteinů pšenice s důrazem na nízkomolekulární gluteniny ve vztahu ke kvalitě produkce**“.

# **Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice**

Jana Bradová, Václav Dvořáček, Lenka Štočková

**METODIKA PRO PRAXI**

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Praha 6 - Ruzyně

2011

## **Využití gelové a čipové elektroforézy k identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice**

Předkládaná metodika zahrnuje optimalizované metodické přístupy pro analýzu podjednotek gluteninů s vysokou molekulovou hmotností (HMW-GS) a podjednotek gluteninů s nízkou molekulovou hmotností (LMW-GS) u pšenice. Klasická elektroforéza v polyakrylamidovém gelu umožňuje současnou klasifikaci obou gluteninových systémů. Automatická čipová elektroforéza je nová moderní technika, která zaručuje podmínky objektivní, rychlé, dostatečně přesné a reprodukovatelné, z hlediska požadavků na bezpečnost práce a bezpečné analýzy gluteninů. Součástí metodiky je hodnocení gluteninových podjednotek z hlediska predikce pekařské jakosti pšenice.

### **The use of gel and chip electrophoresis for the identification of high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits in wheat.**

The presented methodology includes optimized methodological approaches for the analysis of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) and low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) in wheat. The classical polyacrylamide gel electrophoresis enables a simultaneous classification for the both glutenin systems. The automatic chip electrophoresis is a new modern technology ensuring conditions for objective, rapid, sufficiently precise, reproducible and safe (regarding workplace safety requirements) glutenin analysis. A part of the methodology is an evaluation of glutenin subunits in terms of the wheat baking quality prediction.

#### **Oponenti:**

Ing. Ladislava Trbolová  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Praha 5

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.  
Mendelova univerzita, Brno

Metodika je určena pracovníkům zabývajících se šlechtěním pšenice, pracovníkům státní kontroly, jakož i pracovníkům výzkumných organizací a univerzit.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR – odborem rostlinných komodit pod č.j. 1/10967-2011.

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

## Obsah

I. Cíl metodiky.....	4
II. Vlastní popis metodiky.....	4
1. Úvod.....	4
2. Analýza HMW- a LMW- gluteninů metodou vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS.....	4
2.1. Princip metody.....	4
2.2. Technické vybavení.....	5
2.3. Chemikálie.....	5
2.4. Roztoky.....	6
2.5. Pracovní postup.....	8
2.5.1. Příprava vzorků – extrakce.....	8
2.5.2. Příprava gelu.....	9
2.5.3. Nanášení vzorků.....	9
2.5.4. Vlastní elektroforéza.....	10
2.5.5. Fixace, barvení, odbarvení, sušení.....	10
2.6. Vyhodnocení experimentálních dat z SDS-PAGE a jejich interpretace.....	11
3. Analýza HMW- a LMW- gluteninů metodou automatické čipové elektroforézy.....	15
3.1. Princip metody.....	15
3.2. Technické vybavení.....	15
3.2.1. Přístroje a zařízení.....	15
3.2.2. Chemikálie.....	15
3.3. Pracovní postup.....	16
3.3.1. Příprava vzorků – extrakce.....	16
3.3.2. Vlastní postup analýzy na automatické čipové elektroforéze Experion.....	16
3.3.2.1. Složení, skladování, ekvilibrace analytického kitu Experion Pro260 analysis kit ..	16
3.3.2.2. Příprava roztoků gelů.....	17
3.3.2.3. Příprava vzorkového pufu (Pro260 sample buffer).....	17
3.3.2.4. Příprava vzorků a hmotnostního markeru „Pro260 Ladder“.....	17
3.3.2.5. Příprava čipu.....	18
3.3.2.6. Provedení analýzy vzorků.....	19
3.4. Vyhodnocení experimentálních dat z čipové elektroforézy a jejich interpretace.....	19
4. Skladba podjednotek gluteninů a jejich využití pro predikci pekařské kvality pšenice...	22
5. Závěr.....	23
III. Srovnání „novosti postupů“.....	24
IV. Popis uplatnění metodiky.....	24
V. Ekonomické aspekty.....	24
VI. Seznam použité související literatury.....	25
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice.....	25

## I. CÍL METODIKY

Cílem předkládané metodiky je poskytnout standardní postup pro analýzu gluteninů pomocí klasické gelové elektroforézy a nové moderní techniky – automatické čipové elektroforézy (Experion System, Bio-Rad Laboratories, USA).

## II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### 1. Úvod

Dominantní úlohu v technologické jakosti zrna pšenice z pohledu jeho chemického složení hraje bílkovinný komplex, především zásobní prolaminové a glutelinové bílkoviny endospermu pšeničného zrna, které tvoří cca 80 % celkového obsahu bílkovin v zrně pšenice. Zásobní bílkoviny, které jsou hlavní součástí pšeničného lepku, jsou u pšenice nazývány gliadiny a gluteniny. Gluteniny mají polymerní charakter a jejich jednotlivé podjednotky jsou vázány disulfidickými vazbami, které lze účinkem redukčních činidel rozštěpit na vysokomolekulární podjednotky gluteninů (HMW-GS)\* a nízkomolekulární podjednotky gluteninů (LMW-GS)\*. HMW- a LMW-GS vytváří alelické kombinace, na jejichž základě mohou být odrůdy charakterizovány. Jejich výskyt je v přímé vazbě k technologické jakosti zrna pšenice, zejména k pekařské kvalitě, což je důležité pro řadu zpracovatelských technologií. Běžnými postupy separace zásobních bílkovin pšeničného zrna jsou elektroforetické metody, které představují nejjednodušší způsob analýzy HMW-GS a LMW-GS. V posledních letech byla vyvinuta automatická čipová elektroforéza Experion (Experion System, Bio-Rad Laboratories, USA), která představuje moderní analytickou techniku umožňující separaci denaturovaných bílkovin s výsledkem podobným klasické elektroforéze.

\* z angl.: High Molecular Weight Glutenin Subunits; Low Molecular Weight Glutenin Subunits

### 2. Analýza HMW- a LMW- gluteninů metodou vertikální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS PAGE).

#### 2.1. Princip metody

Elektroforézou v širším slova smyslu rozumíme pohyb elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, putujících podle povahy náboje buď k anodě (kladná elektroda) nebo ke katodě (záporná elektroda) v tekutém médiu – elektrolytu. V užším smyslu pak pod tímto pojmem rozumíme řadu metod, které umožňují tento jev sledovat. K nejrozšířenějším elektroforetickým technikám v současnosti patří elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE), která se využívá především v analytice bílkovin. Úspěšnost elektroforetické separace ve značné míře závisí na volbě vhodných podmínek pro provedení procesu, a to zejména na použitém pH. Pro analýzu HMW a LMW gluteninů se nejběžněji používá technika elektroforézy v polyakrylovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS), což je elektroforetický způsob separace na základě velikosti molekul separovaných látek. SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen na základě rozdílné velikosti molekul. Výhodou metody SDS PAGE je možnost charakterizace jak HMW-GS tak LMW-GS současně v jednom gelu. LMW-GS se vyskytují v úzkém spojení s gama a omega gliadiny, proto musí vlastní elektroforéze předcházet speciální vícenásobná extrakce, kdy

dochází k odseparování gliadinů. Předností metody je genetická interpretace získaných výsledků tj. jejich vyjádření ve formě gluteninových alelických vzorců - tzn. relativní nezávislost na případných metodických odchylkách v hodnotách relativních elektroforetických mobilit na jednotlivých gelech. Metoda SDS PAGE je doporučena mezinárodní organizací UPOV (Union for The Protection of New Varieties of Plants) k testování odlišnosti, homogenity a stálosti odrůd (Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability - TG/3/11 94-11-04 ).

Úskalím metody je rizikovitost používaných chemikálií. Akrylamid a bisakrylamid jsou neurotoxické látky, proto je nutno s těmito látkami pracovat vždy s co největší opatrností (gumové rukavice, rouška, **nikdy** jejich roztoky nepipetovat ústy!).

## 2.2. Technické vybavení

### Přístroje a zařízení

- přístroj pro vertikální elektroforézu (doporučená síla gelu -1,5 mm)
- zdroj stejnosměrného proudu (možnost nastavení jak konstantního proudu, tak i konstantního napětí)
- chladicí termostat
- laboratorní centrifuga (10 000 × g, cca 12 000 ot/min) pro plastové mikrozkušavky objemů 1,5 ml a 2,0 ml
- prosvětlovací panel
- vortexová třepačka (vortex)
- elektromagnetická míchačka
- vyhřívaná vodní lázeň (požadovaná teplota 65°C)
- ultrazvuková lázeň
- laboratorní digestoř
- chladnička
- pH metr

### Sklo, laboratorní pomůcky

Běžné laboratorní sklo a plast, nádoby na fixaci a barvení gelů, stojánky, kádinky, odměrné válce, špičky, 2ml a 1,5ml plastové centrifugační mikrozkušavky, injekční stříkačka s jehlou, mikrostríkačka Hamilton, automatické pipety, osobní ochranné pracovní prostředky - respirátor, rukavice!

## 2.3. Chemikálie (Všechny chemikálie stupně „analytical reagent“ - p.a.)

### Chemikálie pro extrakci proteinů

- Ethanol
- 1-Propanol
- Tris(hydroxymethyl) aminomethan (Tris)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Dodecylsulfát sodný (SDS)
- Glycerol
- Bromfenolová modř
- 2-Merkaptoethanol
- 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- 4-Vinylpyridin (VP)



### Chemikálie pro elektroforézu

- Akrylamid (AA)
- Bisakrylamid (BIS)
- 40% Akrylamid (AA-40) komerční roztok
- 2% Bisakrylamid (BIS-2) komerční roztok
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Bromfenolová modř
- Dodecylsulfát sodný (SDS)
- Persíran amonný (APS)
- TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin)
- Glycin

### Chemikálie pro fixaci, barvení a sušení gelů

- Kyselina trichloroctová (TCA)
- Kyselina octová
- Glycerol
- Methanol
- Coomassie Brilliant Blue R-250

## 2.4. Roztoky

Tabulka 1: Extrakční roztoky

č.	Roztok	Složky	Množství	poznámka
E1	60% Ethanol	96% Ethanol Destilovaná voda	60 ml 36 ml	skladovat v chladničce
E2	50% 1-Propanol v 0,08 M Tris-HCl pH 8,0	1-Propanol  E3	50 ml  50 ml	skladovat v chladničce
E3	0,08 M Tris-HCl pH 8,0	Tris  Destilovaná voda	4,844 g rozpusť a doplň do 500 ml	-upravit pH na 8,0 přidáním HCl - skladovat v chladničce
E4	<b>Vzorkový pufr</b>	SDS Glycerol Bromfenolová modř 2-Merkaptoetanol Roztok E3	2 g 40 ml 0,02 g 1 ml do 100 ml	skladovat v chladničce
E5	<b>Roztok E2 + DTT</b>	DTT Roztok E2	40 mg 4 ml	používat vždy čerstvý
E6	<b>Roztok E2 + VP</b>	VP Roztok E2	60 µl 4 ml	používat vždy čerstvý
E7	<b>Extrační roztok pouze pro HMW-GS</b>	Roztok Z2 Roztok Z4 Glycerol 2-Merkaptoetanol Destilovaná voda	30 ml 24 ml 12 ml 6 ml 48 ml	skladovat v digestoři

**Tabulka 2:** Zásobní roztoky pro elektroforézu

č.	Roztok	Složky	Množství	poznámka
Z1	<b>Gelový pufr 8,8:</b> 0,75 M Tris-HCl pH 8,8	Tris Destilovaná voda	45,5 g TRIS do 500 ml	-upravit pH na 8,8 přidáním HCl - skladovat v chladniče
Z2	<b>Gelový pufr 6,8:</b> 0,25 M Tris-HCl pH 6,8	Tris Bromfenolová modř Destilovaná voda	6,1 g špetka do 200 ml	-upravit pH na 6,8 přidáním HCl -skladovat v chladniče
Z3	<b>AA a BIS</b>	Akrylamid Bisakrylamid Destilovaná voda	150 g 4 g do 500 ml	skladovat za lab. teploty
Z4	<b>10% roztok SDS</b>	SDS Destilovaná voda	5 g do 50 ml	skladovat za lab. teploty
Z5	<b>10% roztok APS</b>	APS Destilovaná voda	0,5 g do 5 ml	připravovat vždy čerstvý
Z6	<b>Zásobní elektroodový pufr:</b> 0,25 M Tris; 1,92 M glycin pH 8,3	Tris Glycin SDS Destilovaná voda	30,3 g 144 g 10 g do 1000 ml	skladovat za lab. teploty
Z7	<b>Provozní pufr</b>	Zásobní elektroodový pufr Destilovaná voda	100 ml 900 ml	připravovat vždy čerstvý

**Tabulka 3:** Roztoky pro fixaci, barvení a sušení gelů

Pozn.: uvedené roztoky možno použít opakovaně (max.10x)

č.	Roztok	Složky	Množství	poznámka
F1	<b>Fixační činidlo:</b> 20% TCA	TCA Destilovaná voda	200 g do 1000 ml	skladovat za lab. teploty
S1	<b>Směsný roztok</b>	Methanol Kyselina octová Destilovaná voda	250 ml 100 ml 650 ml	skladovat za lab. teploty
B1	<b>Barvicí roztok</b>	Commasie Brilliant Blue R 250 Směsný roztok	0,25 g do 500 ml	skladovat za lab. teploty
G1	<b>2% roztok glycerolu</b>	Glycerol Destilovaná voda	20 ml 980 ml	skladovat v chladniče

## 2.5. Pracovní postup

### 2.5.1. Příprava vzorků - extrakce

#### První den:

- 1) Jednotlivá zrna roztlouci pečlivě kladívkem mezi dvěma listy papíru a převést do 2ml centrifugačních mikrozkušavek.
- 2) Přidat 0,5 ml extrakčního roztoku **E1**, protřepat na vortexu a nechat stát ve tmě přes noc  
Pozn.: alternativa - 1h inkubovat při 65°C ve vodní lázni.

#### Druhý den:

- 1) Vložit na 10 min do ultrazvukové lázně.
- 2) 30 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 3) 5 min centrifugovat (10 000 × g) a supernatant odstranit.
- 4) K pevnému zbytku (peletě) přidat 0,5 ml extrakčního roztoku **E1**.
- 5) Peletu dobře promíchat jehlou a krátce protřepat na vortexu.
- 6) Vložit na 10 min do ultrazvukové lázně.
- 7) 30 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 8) 5 min centrifugovat (10 000 × g) a supernatant odstranit.
- 9) K pevnému zbytku (peletě) přidat 0,5 ml extrakčního roztoku **E1**.
- 10) Peletu dobře promíchat jehlou a krátce protřepat na vortexu.
- 11) Vložit na 10 min do ultrazvukové lázně.
- 12) 30 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 13) 5 min centrifugovat (10 000 × g) a supernatant odstranit.
- 14) Přidat 100 µl roztoku **E5 (E2 + DTT)** – v digestoři.
- 15) Peletu dobře promíchat jehlou a krátce protřepat na vortexu.
- 16) Vložit na 10 min do ultrazvukové lázně.
- 17) 30 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 18) Přidat 100 µl roztoku **E6 (E2 + VP)** – v digestoři, krátce protřepat na vortexu.
- 19) 15 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 20) 3 min centrifugovat (10 000 × g).
- 21) 100 µl přenést do nové 1,5ml mikrozkušavky.
- 22) Přidat 100 µl vzorkového pufru.
- 23) 15 min inkubovat ve vodní lázni při 65°C.
- 24) 3 min centrifugovat (10 000 × g).

Pozn.: Pokud chceme analyzovat pouze HMW-GS, použijeme zjednodušenou extrakci:

Jednotlivá zrna roztlouci kladívkem mezi dvěma listy papíru a převést do 2ml centrifugačních mikrozkušavek. Na 1 rozmělněné zrno použít 0,3 ml extrakčního roztoku **E7**. Vzorky nechat 2 hodiny extrahovat a poté zahřát 2 minuty na vroucí vodní lázni. Po vychladnutí mikrozkušavky 4 min. centrifugovat (10 000 x g) a supernatanty se převést do nových 1,5ml mikrozkušavek.

Získané extrakty jsou připraveny pro elektroforézu. Lze je skladovat několik týdnů v chladničce (případně v mrazničce).

## 2.5.2. Příprava gelu

**Tabulka 4:** Složení gelových roztoků

Roztok	10% dělicí gel		4,6% zaostřovací (sběrný) gel	
		alternativa		alternativa
<b>Z3</b> (AA+BIS)	32,60 ml	-	12,50 ml	-
40% akrylamid (AA-40)	-	24,50 ml	-	9,40 ml
2% bisakryamid (BIS-2)	-	13,00 ml	-	5,00 ml
<b>Z1</b> (Gelový pufr 8,8)	48,80 ml	48,80 ml	-	-
<b>Z2</b> (Gelový pufr 6,8)	-	-	41,70 ml	41,70 ml
<b>Z4</b> (SDS)	980 µl	980 µl	830 µl	830 µl
destilovaná voda	16,30 ml	12,70 ml	43,80 ml	43,10 ml
TEMED	58 µl	58 µl	33 µl	33 µl
<b>Z5</b> (APS)	980 µl	980 µl	830 µl	830 µl

Pozn.:

- V tabulce 4 je složení uvedeno na 100 ml celkového množství jednotlivých gelových roztoků.
- Množství gelových roztoků je nutno přizpůsobit typu přístroje a velikosti desek.
- Objem gelového roztoku potřebného k přípravě zaostřovacího gelu je cca v poměru 1:5 k objemu dělicího gelového roztoku.

### Postup při přípravě a nalévání gelu

(Každý gel se skládá z dělicího a zaostřovacího gelu)

- 1) Dle typu přístroje sestavit suché a čisté gelové kazety.
- 2) Připravit 10% dělicí gel (Tabulka 4) - jednotlivé složky přidávat za pomalého míchání v pořadí tak, jak je uvedeno v tabulce 4 (polymerace je nastartována přidáním TEMEDu a APS) (k míchání možno použít elektromagnetickou míchačku).
- 3) Gelový roztok pečlivě nalít mezi skla tak, aby se netvořily vzduchové bublinky.
- 4) Gelové kazety naplnit 30 mm pod okraj (prostor pro 30 mm vrstvu zaostřovacího gelového roztoku).
- 5) Povrch gelového roztoku převrstvit opatrně vodou (injekční stříkačkou) a nechat 30 minut polymerovat.
- 6) Po skončení polymerace vodu slít, povrch gelu osušit filtračním papírem a kazety se až po okraj naplnit zaostřovacím gelovým roztokem.
- 7) 4,6% zaostřovací (sběrný) gel (Tabulka 4) připravit bezprostředně před naléváním podobně jako gel dělicí a nalít na spodní gel.
- 8) Ihned vložit hřebeny pro tvorbu jamek - polymerace probíhá cca 60 minut.
- 9) Bezprostředně před vlastní elektroforézou hřebeny opatrně vyjmout, jamky v gelu promýt elektrodovým pufrem **Z7** pomocí injekční stříkačky (doporučuje se připravit si gely den předem před vlastní elektroforézou a skladovat v chladničce).

## 2.5.3. Nanášení vzorků

Množství nanášeného extraktu záleží na velikosti jamky (typ přístroje, velikost hřebenu). U většiny běžných typů vertikálních elektroforetických jednotek se doporučuje aplikovat mikrostríkačkou Hamilton 15 – 20 µl extraktu (Postup dle 2.5.1.) do každé gelové jamky.

#### 2.5.4. Vlastní elektroforéza

**Tabulka 5:** Provozní podmínky SDS PAGE pro analýzu HMW- a LMW-GS

<b>Elektrodový pufr</b>	<b>Z7 – provozní pufr</b>
<b>Proud</b>	0,2 mA/ mm <sup>2</sup> gelu (1gel- 14 cm šířka; 1mm tloušťka = 28mA)
<b>Napětí</b>	doporučeno max. 300 V (konstantní proud)
<b>Teplota</b>	8°C
<b>Směr migrace</b>	od katody (-) k anodě (+)

Doba dělení: Jakmile trakční barvivo dosáhne spodního okraje separačního gelu, doba dělení se prodlouží o 30 minut.

#### 2.5.5. Fixace, barvení, odbarvení, sušení

##### Fixace:

- 1) Skleněné desky s gelem vyjmout z přístroje.
- 2) Gel sejmout, přenést do nádoby s fixačním roztokem **F1** a fixovat 60 minut.
- 3) Odstranit roztok **F1**, gel přelít směsným roztokem **S1** a v roztoku ponechat 30 minut.

##### Barvení:

- 1) Odstranit roztok **S1** a gel se přelít barvicím roztokem **B1**.
- 2) Gely se barví přes noc (bez třepání).

##### Odbarvení:

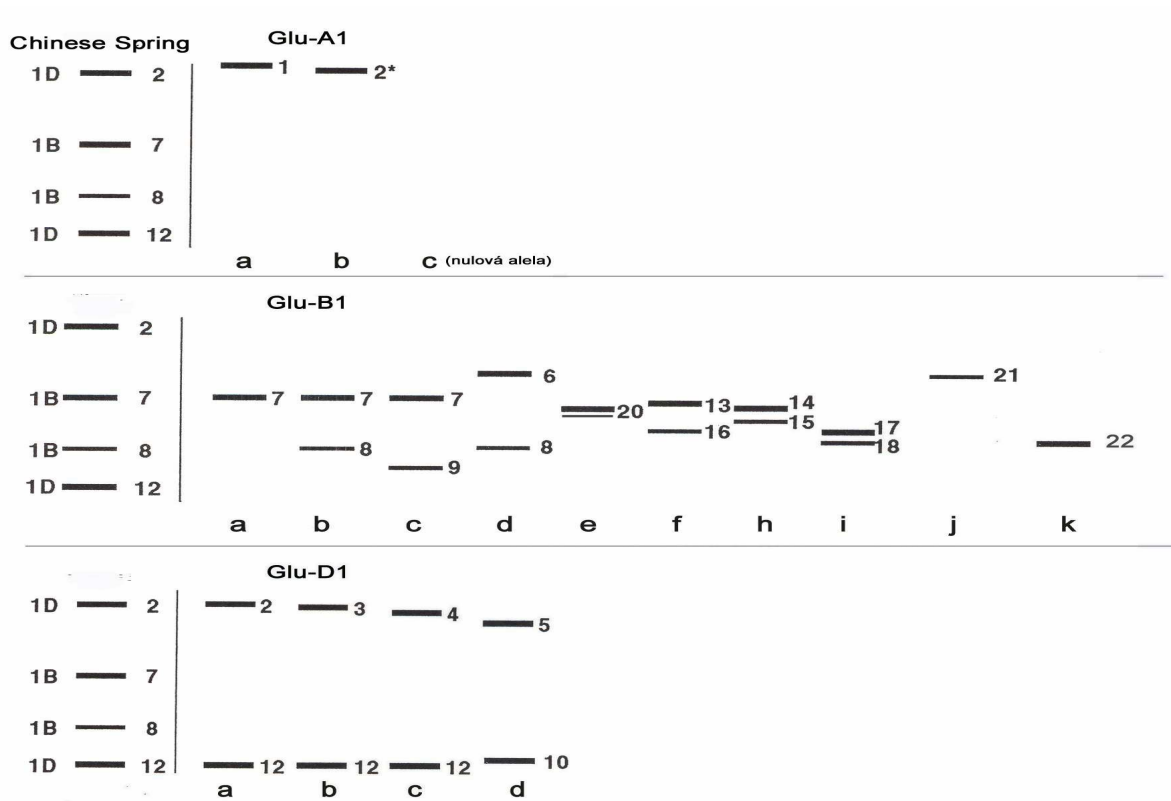
- 1) Odstranit roztok **B1** a gel přelít směsným roztokem **S1**; odbarvovat 60 minut.
- 2) Odstranit roztok **S1** (lze znovu použít po filtraci přes aktivní uhlí) a nakonec přelít gely destilovanou vodou.

##### Sušení

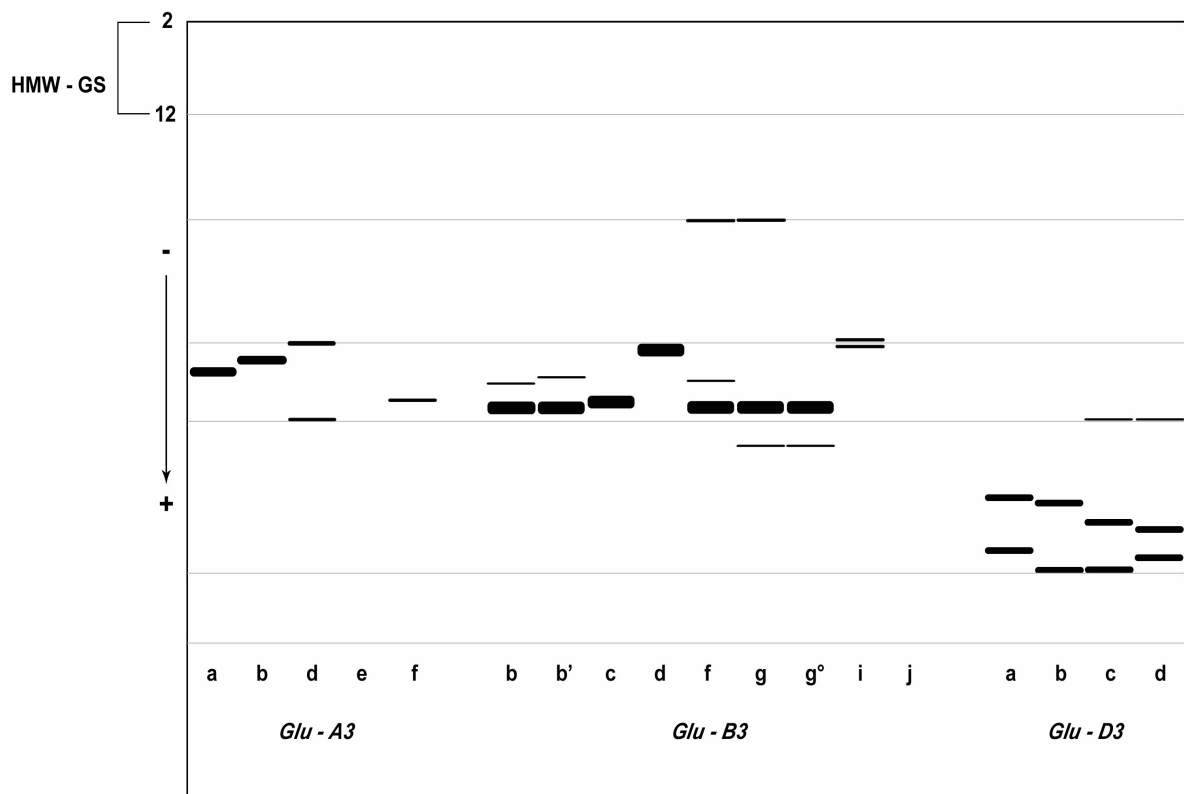
Připravit skleněnou desku (rozměry desky musí být větší než velikost výsledného PAGE gelu). Dále je nutno připravit dva obdélníky z celofánu (rozměry prvního obdélníku se rovnají rozměrům skleněné desky; (strany druhého obdélníku jsou cca o 2 cm delší než strany skleněné desky). Takto připravený celofán a PAGE gel ponořit do připraveného roztoku **G1** (cca 2 hodiny). Poté 1. celofánový obdélník položit na skleněnou desku, na něj umístit PAGE gel a přikrýt 2. celofánovým obdélníkem. Okraje celofánu přehnout pod skleněnou desku a plochu eventuálně vyhladit plastovým válečkem (odstranění vzduchových bublin). Sušit při laboratorní teplotě v dostatečné vzdálenosti od zdrojů tepla a světla.

## 2.6. Vyhodnocení experimentálních dat z SDS PAGE (interpretace elektroforetických profilů HMW- a LMW-podjednotek gluteninů)

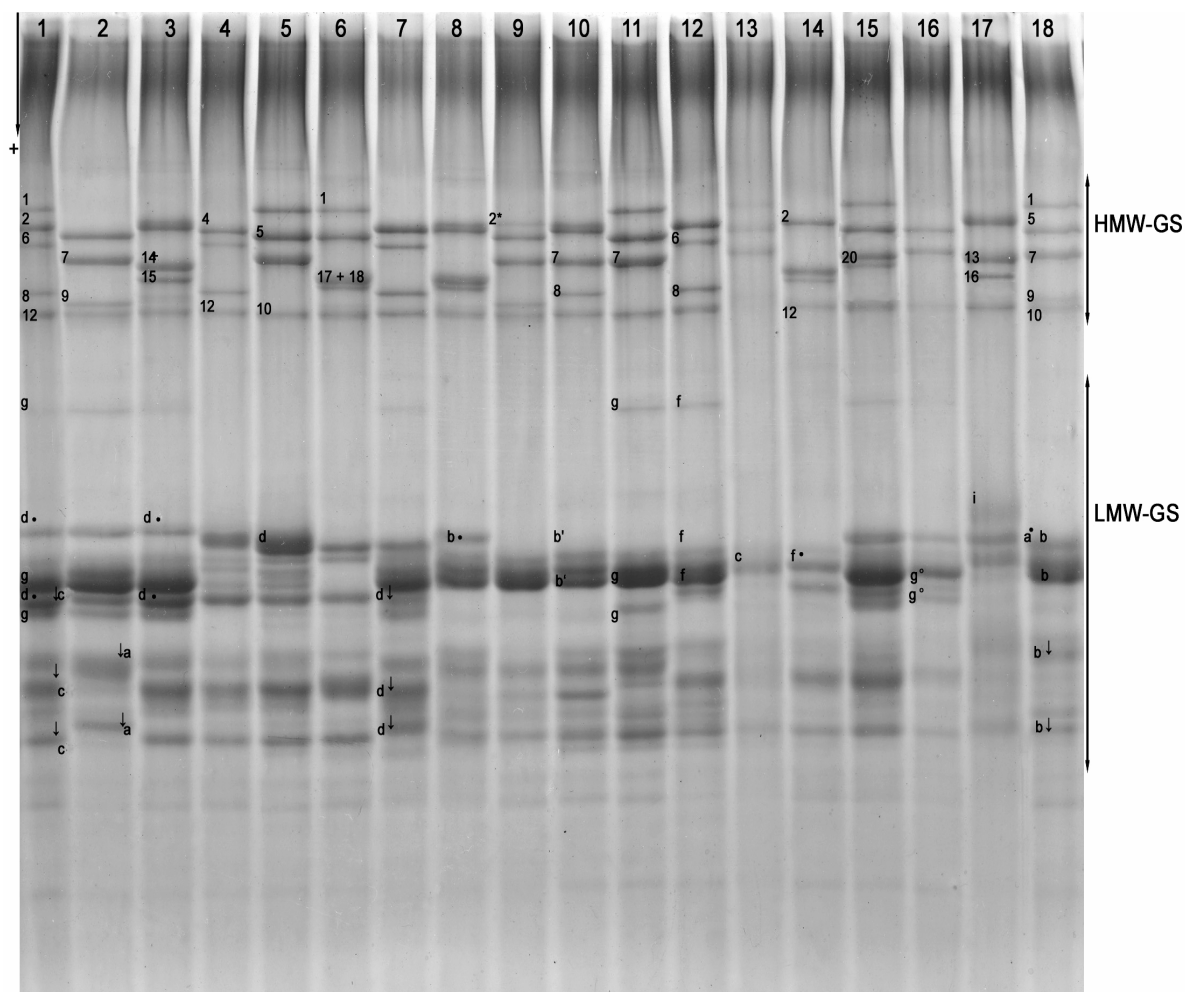
- 1) Syntéza HMW-GS je řízena třemi geny *Glu A1*, *Glu B1* a *Glu D1* lokalizovanými na dlouhém rameni první homeologické skupiny chromosomů.
- 2) Syntéza LMW-GS je řízena třemi geny *Glu A3*, *Glu B3* a *Glu D3* lokalizovanými na krátkém rameni první homeologické skupiny chromosomů.
- 3) Vyhodnocení získaných elektroforeogramů se provádí pomocí schématického znázornění elektroforetických mobilit jednotlivých podjednotek (Obrázek 1; Obrázek 2)
- 4) Pro HMW-GS, které se nalézají v horní polovině elektroforetického spektra (Obrázek 3), byl navržen jak systém číslování jednotlivých podjednotek, tak systém značení jednotlivých alel písmeny. LMW-GS alely (v dolní polovině elektroforetického spektra) jsou popsány pouze písmeny a každé písmeno označuje skupinu bílkovinných pruhů (podjednotek) pro každý ze tří genů *Glu A3*, *Glu B3* a *Glu D3* (Obrázek 3).
- 5) Elektroforetické spektrum gluteninů pak lze zapsat tzv. gluteninovým alelickým vzorcem pomocí číslic (HMW-GS) či pomocí písmen (LMW-GS, HMW-GS), (Tabulka 6).
- 6) Elektroforetické mobility HMW-GS alel (Obrázek 1) byly popsány na základě odrůdy Chinese Spring (Payne, Lawrence, 1983), která je charakterizována nulovou alelou na *Glu A1* (*Glu-A1c*) a dále alelami *Glu-B1b* (7+8) a *Glu-D1a* (2+12).
- 7) Při výše nastavených podmínkách SDS PAGE HMW-gluteninové podjednotky 10 a 12 se nalézají v téměř totožné poloze (Obrázek 1, Obrázek 3). Vzhledem k tomu, že se vždy vyskytují ve dvojicích 5+10 a 2+12, 3+12, 4+12 a podjednotky 5 a 2, 3, 4 jsou vzájemně velmi dobře rozlišitelné, může být identifikace 5+10 (*Glu-D1d*) a 2+12 (*Glu-D1a*), 3+12 (*Glu-D1b*), 4+12(*Glu-D1c*) jednoznačně provedena.
- 8) Elektroforetické mobility LMW-GS alel (Obrázek 2) byly popsány na základě elektroforetických mobilit HMW-gluteninových podjednotek 2+12. Pro snadnější orientaci mřížka ve schématu označuje pozice HMW podjednotek 2+12, pozice nejpomalejších LMW-podjednotek (součást *Glu-B3f* a *Glu-B3g*), pozice dvou LMW-podjednotek alely *Glu-A3d* a pozice nejrychlejších LMW-GS (součást *Glu-D3b* a *Glu-D3c*).
- 9) Do každého elektroforetického běhu se doporučuje k analyzovaným odrůdám zařadit dva snadno dostupné genotypy jako standardy se známým složením a vysokou variabilitou HMW- a LMW-GS alel, což značně usnadní identifikaci jednotlivých gluteninových alel (Obrázek 3). Doporučené genotypy, které na vyžádání poskytuje Genová banka VÚRV, v.v.i., jsou odrůdy Globus a Saxana a jejich charakterizace je uvedena v tabulce 6.
- 10) Pokud nelze s jistotou identifikovat jakoukoliv gluteninovou alelu, je možno v následující elektroforetické analýze k upřesnění využít odrůdy, jejichž profily jsou prezentované na obrázku 3 se složením gluteninových alel uvedeným v tabulce 6.
- 11) HMW-GS alela *Glu-A1c* a LMW-GS alely *Glu-A3e*, *Glu-B3j* jsou nulové alely, nejsou charakterizovány žádným pruhem (Obrázky 1 a 2).
- 12) LMW-GS alela *Glu-A3f* je velmi obtížné identifikovat, protože je často skryta podjednotkami, které se vyskytují na *Glu-B3* lokusu (Obrázek 2). Nelze pak s určitostí říci, zda je genotyp charakterizován *Glu-A3f* či nulovou alelou *Glu-A3e*. Z tohoto důvodu byly tyto dvě alely v některých případech kombinovány *Glu-A3e/f* (Tabulka 6), (Branlard et al., 2003).
- 13) Na obrázku 3 jsou vyznačeny u modelových odrůd pšenice běžně se vyskytující HMW- a LMW-GS alely.
- 14) V tabulce 6 jsou sumarizovány gluteninové charakteristiky všech odrůd prezentovaných na obrázku 3.



**Obrázek 1:** Schématické znázornění elektroforetických mobilit HMW-GS alel kódovaných geny v lokusu *Glu-1*



**Obrázek 2:** Schématické znázornění elektroforetických mobilit LMW-GS alel kódovaných geny v lokusu *Glu-3*



**Obrázek 3:** Označení jednotlivých HMW- a LMW- gluteninových podjednotek na SDS PAGE gelu (HMW-GS jsou označeny čísly; LMW-GS písmeny - symbol • značí LMW-GS na *Glu-A3*, LMW-GS na *Glu-B3* jsou bez symbolu, symbol ↓ značí LMW-GS na *Glu-D3*)



**Tabulka 6:** Alelické složení HMW-GS a LMW-GS modelových odrůd pšenice uvedených na obrázku 3.

Číslo dráhy	Název odrůdy	HMW-GS			LMW-GS		
		<i>Glu - A1</i>	<i>Glu - B1</i>	<i>Glu - D1</i>	<i>Glu - A3</i>	<i>Glu - B3</i>	<i>Glu - D3</i>
1	Globus	<b>a</b> (1)	<b>d</b> (6+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>c</b>
2	Trappe	<b>c</b> (0)	<b>c</b> (7+9)	<b>d</b> (5+10)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>a</b>
3	Swedjet	<b>c</b> (0)	<b>h</b> (14+15)	<b>a</b> (2+12)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>c</b>
4	Corsaire	<b>c</b> (0)	<b>d</b> (6+8)	<b>c</b> (4+12)	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>c</b>
5	Zuzana	<b>a</b> (1)	<b>a</b> (7)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>d</b>	<b>c</b>
6	Rialto	<b>a</b> (1)	<b>i</b> (17+18)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>j</b>	<b>c</b>
7	Brimstone	<b>c</b> (0)	<b>d</b> (6+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>a</b>	<b>g</b>	<b>d</b>
8	Gabo	<b>b</b> (2*)	<b>i</b> (17+18)	<b>a</b> (2+12)	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
9	Ilona	<b>b</b> (2*)	<b>c</b> (7+9)	<b>d</b> (5+10)	<b>e/f</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
10	Radja	<b>b</b> (2*)	<b>b</b> (7+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>e</b>	<b>b'</b>	<b>b</b>
11	Bravura	<b>a</b> (1)	<b>a</b> (7)	<b>d</b> (5+10)	<b>e/f</b>	<b>g</b>	<b>b</b>
12	Biscay	<b>c</b> (0)	<b>d</b> (6+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>e/f</b>	<b>f</b>	<b>c</b>
13	Amaretto	<b>a</b> (1)	<b>c</b> (7+9)	<b>d</b> (5+10)	<b>e/f</b>	<b>c</b>	<b>c</b>
14	Rapsodia	<b>c</b> (0)	<b>i</b> (17+18)	<b>a</b> (2+12)	<b>f</b>	<b>j</b>	<b>c</b>
15	Ilias	<b>a</b> (1)	<b>e</b> (20)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>g</b>	<b>c</b>
16	Iridium	<b>c</b> (0)	<b>a</b> (7)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>g<sup>o</sup></b>	<b>c</b>
17	Magnif 24	<b>b</b> (2*)	<b>f</b> (13+16)	<b>a</b> (2+12)	<b>a</b>	<b>i</b>	<b>b</b>
18	Saxana	<b>a</b> (1)	<b>c</b> (7+9)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b</b>

### 3. Analýza HMW- a LMW- gluteninů metodou automatické čipové elektroforézy

#### 3.1. Princip metody

Automatická čipová elektroforéza Experion (Experion System, Bio-Rad Laboratories, USA) představuje moderní analytickou techniku umožňující separaci denaturovaných bílkovin s výsledkem podobným klasické SDS PAGE. Na rozdíl od SDS PAGE poskytuje analýza na čipové elektroforéze celou řadu výhod, a to zejména rychlost, jednoduchost a vysokou opakovatelnost provedení analýz, objektivnost při detekci a vyhodnocení, ale i větší pracovní bezpečnost, protože odpadá práce s toxickými monomery akrylamidu při přípravě gelů. Hlavní výhodou systému je vzájemné propojení separace bílkovin, jejich detekce a zpracování dat do jednoho komplexního systému, který eliminuje časově náročné kroky, které vyžaduje klasická SDS PAGE. Analýza bílkovin je provedena prostřednictvím dodávaného analytického kitu „Experion Pro260 Analysis Kit“, který obsahuje sadu analytických čipů, reagensií a ostatních doplňků pro provedení separace bílkovin. S využitím uvedeného analytického kitu je možné provést vlastní analýzu 10 vzorků během 30 minut. Tato moderní metoda by mohla být značným přínosem pro šlechtitele především k testování gluteninového složení populací pšenice v raných stádiích šlechtitelského procesu, ale i pro hodnocení genetických zdrojů genových bank pro svou již zmíněnou objektivitu a efektivnost hodnocení.

#### 3.2. Technické vybavení

##### 3.2.1. Přístroje a zařízení

- systém automatické čipové elektroforézy Experion System dodávaný firmou Bio-Rad Laboratories, USA
- stanice pro zavádění gelu do mikrofluidního systému analytického čipu tzv. „priming station“ dodávaná firmou Bio-Rad Laboratories (USA) jako součást čipové elektroforézy Experion
- počítač s nainstalovaným ovládacím a vyhodnocovacím softwarem Experion Bio-Rad Laboratories, Version 3.0
- vortexová třepačka (vortex)
- vyhřívaná vodní lázeň (požadované teploty 65°C a 95-100°C)
- laboratorní centrifuga (10 000 × g, cca 12 000 ot/min) pro plastové mikrozkuhavky objemů 1,5 ml a 2,0 ml
- stolní minicentrifuga
- chladnička
- předvážky a analytické váhy
- sada pipet o rozsahu 1-10 µl, 10-100 µl a 100-1000 µl
- pH metr
- běžný laboratorní plast a sklo - stojánky, kádinky, odměrné válce, špičky, 2,0ml 1,5ml a 0,5ml plastové centrifugační mikrozkuhavky, automatické pipety, osobní ochranné pracovní prostředky – respirátor (rouška), rukavice!

##### 3.2.2. Chemikálie

- analytický kit „Pro260 Analysis Kit“, který obsahuje sadu analytických čipů, a veškeré reagenty potřebné k analýze
- Experion DEPC-Treated Water
- Dimethyl sulfoxid (DMSO)
- 1-Propanol

- Dithiotreitol (DTT)
- Dodecylsulfát sodný (SDS)

### 3.3. Pracovní postup

#### 3.3.1. Příprava vzorků - extrakce

- 1) Roztlouci jednotlivá zrna pečlivě kladívkem mezi dvěma listy papíru.
- 2) Odvážit  $30 \pm 2$  mg do 2,0ml plastových mikrozkuvek .
- 3) Přidat 1 ml dimethyl sulfoxidu (DMSO). Směs ihned protřepat na vortexu, extrahovat 10 min.
- 4) Centrifugovat mikrozkuvky (3 min,  $10\,000 \times g$ ) a odstranit supernatant.
- 5) Přidat 1 ml 50% vodného roztoku 1-propanolu (1 díl 1-propanolu smíchat s 1 dílem destilované vody), protřepat na vortexu, extrahovat 10 min.
- 6) Centrifugovat mikrozkuvky (3 min,  $10\,000 \times g$ ) a odstranit supernatant.
- 7) Přidat 1 ml 50% vodného roztoku 1-propanolu, protřepat na vortexu, extrahovat 10 min.
- 8) Centrifugovat mikrozkuvky (3 min,  $10\,000 \times g$ ) a odstranit supernatant.
- 9) Přidat 0,3 ml extrakčního roztoku, a důkladně protřepat na vortexu několik sekund.
- 10) Vložit na 30min do lázně zahřáté na  $65^{\circ}\text{C}$ .
- 11) Centrifugovat (4min,  $10\,000 \times g$ ).
- 12) Čistý supernatant přemístit do nově popsané 1,5ml mikrozkuvky.

Extrakční roztok – 1%ní roztok dodecylsulfátu sodného (SDS) s obsahem 1 procenta dithiothreitolu (DTT) – připravovat vždy čerstvý!

Zásobní roztok (1% vodný roztok SDS) může být skladován při laboratorní teplotě (1 g SDS rozpustit a doplnit do 100 ml destilovanou vodou).

Extrakční roztok se připraví rozpuštěním 100 mg DTT v 10 ml zásobního roztoku (1% vodný roztok SDS) – uvedené množství je pro 25 vzorků.

#### 3.3.2. Vlastní postup analýzy na automatické čipové elektroforese Experion

K analýze bílkovin na automatické čipové elektroforeze je nutný komerčně dodávaný analytický kit „*Experion Pro260 analysis kit*“ obsahující sadu čipů po 10 nebo 25 kusech a soubor specifických chemikálií nezbytných pro přípravu analyzovaných vzorků a čipů („*Pro260 Kit Reagents*“).

##### 3.3.2.1 Složení, skladování a ekvibrace analytického kitu *Experion Pro260 analysis kit*

Příslušný kit obsahuje 10 resp. 25 analytických čipů a 1 čip pro čištění elektrod čipové elektroforezy. Tyto komponenty kitu lze skladovat při pokojové teplotě. Citlivou součástí analytického kitu jsou reagenty (chemikálie), jež je nutné v původním kartonovém boxu skladovat ve tmě (reagenty jsou velmi citlivé na světlo) a při  $4^{\circ}\text{C}$ . Při splnění podmínek skladování je životnost chemikálií i čipů 9 měsíců – datum ukončení expirace je vyznačeno na každém balení kitu.

Reagenty obsažené v analytickém kitu pro 10 čipů jsou následující:

- 3 mikrozkuvky s 520  $\mu\text{l}$  gelu „*Pro260 gel*“ - zelený uzávěr
- 1 mikrozkuvka se 45  $\mu\text{l}$  fluorescenční barvy „*Pro260 stain*“ - modrý uzávěr
- 1 mikrozkuvka se 400  $\mu\text{l}$  vzorkového pufru „*Pro260 sample buffer*“ - žlutý uzávěr
- 1 mikrozkuvka se 60  $\mu\text{l}$  proteinového standardu „*Pro260 ladder*“ - červený uzávěr

- 1) Před použitím je nutno reagentie 15-20 minut vytemperovat při pokojové teplotě.
- 2) Vzhledem k citlivosti reagentie na světlo je nutné reagentie po celou dobu temperování i další práce maximálně chránit před světlem.
- 3) Po uplynutí doby temperování je nutné mikrozkuhavky obsahující reagentie krátce promíchat na vortexu a poté krátce centrifugovat, aby veškerý obsah mikrozkuhavky klesl ke dnu.

### 3.3.2.2. Příprava roztoků gelů

#### Příprava gelu s fluorescenční barvou (Pro260 gel-stain; GS)

- 1) Gel s fluorescenční barvou je připraven přidáním 20  $\mu$ l barvy „Pro260 stain“ (modrý uzávěr) k obsahu (520  $\mu$ l) mikrozkuhavky s bezbarvým gelem (označení „Pro260 gel“, zelený uzávěr).
- 2) Vzniklý obarvený gel („Pro260 gel-stain“; GS) krátce promíchat na vortexu.
- 3) Přenést obsah obarveného gelu do mikrozkuhavky s filtrační kolonkou (je součástí kitu) a provést filtraci na centrifuze při 10 000  $\times$  g po dobu 5 minut.
- 4) Po centrifugaci vizuálně zkontrolovat zda byl gel přefiltrován, kolonku vyjmout, mikrozkuhavku s přefiltrovaným gelem obalit alobalem a na víčku označit **GS** (gel-stain nebo-li gel obarvený fluorescenční barvou).

#### Příprava bezbarvého gelu (Pro260 gel, G)

- 1) Celý obsah (520  $\mu$ l) neobarveného gelu (označení „Pro260 gel“; zelený uzávěr) přenést do mikrozkuhavky s filtrační kolonkou (je součástí kitu) a provést filtraci na centrifuze při 10 000  $\times$  g po dobu 5 minut.
- 2) Po centrifugaci vizuálně zkontrolovat zda byl gel přefiltrován, kolonku vyjmout, mikrozkuhavku s přefiltrovaným gelem obalit alobalem a na víčku označit **G** (bezbarvý gel).

Pozn.: Oba typy takto připravených, filtrovaných gelových roztoků mohou být skladovány až 1 měsíc při 4°C ve tmě. Po měsíci by měl být nepoužitý gel opětovně filtrován.

### 3.3.2.3. Příprava vzorkového pufru (Pro260 sample buffer)

- 1) Ze zásobního roztoku vzorkového pufru (označení „Pro260 sample buffer“, žlutý uzávěr) odebrat 30  $\mu$ l do 0,5 ml mikrozkuhavky (není součástí kitu) a k tomuto objemu přidat 1  $\mu$ l Experion DEPC-Treated Water
- 2) Následně je nutné obsah důkladně promíchat na vortexu a krátce centrifugovat.  
**Pozn.:** Vzorkový pufr připravovat vždy čerstvý pro analýzu každého čipu.

### 3.3.2.4. Příprava vzorků a hmotnostního markeru „Pro260 Ladder“

- 1) Hmotnostní marker (označení „Pro260 Ladder“; červený uzávěr) a vzorky určené k analýze se připravují jednotným způsobem.
- 2) Do označených mikrozkuhovek (objem 0,5 ml) přenést 4  $\mu$ l hmotnostního markeru (na každý čip je nutno nanést hmotnostní marker) nebo 4  $\mu$ l vzorku a přidají se 2  $\mu$ l připraveného vzorkového pufru.
- 3) Připravené vzorky a hmotnostní marker důkladně promíchat pomocí vortexu a centrifugovat pomocí stolní minicentrifugy.

- 4) Vzorky a hmotnostní marker zahřát ve vodní lázni na teplotu 95-100°C po dobu 3 - 5 minut.
- 5) Po zchlazení je nutné vzorky opět centrifugovat (15 vteřin), aby se veškerý obsah mikrozkušavky nacházel na jejím dně.
- 6) Poté se do každé mikrozkušavky se vzorkem či hmotnostním markerem přidat 84  $\mu$ l Experion DEPC-Treated Water a opět krátce promíchat pomocí vortexu a krátce centrifugovat.
- 7) Vzorky a hmotnostní marker jsou připraveny k aplikaci do vzorkových jamek čipu.
- 8) Vzorky a hmotnostní marker jsou v tomto stavu při pokojové teplotě stabilní několik hodin, ale je nutné chránit je před světlem.

### 3.3.2.5. Příprava čipu

Po vyjmutí čipu z obalu se provede aplikace filtrovaných gelových roztoků, vzorků a hmotnostního markeru do jamek na lícové straně čipu dle níže uvedeného postupu. Obrázek 1 schématicky znázorňuje analytický čip systému Experion a může sloužit k lepší orientaci v následujícím textu.



**Obrázek 4:** Schématické znázornění analytického čipu „Experion Pro260“

- 1) V první fázi přípravy čipu nutno aplikovat 12  $\mu$ l filtrovaného gelu s fluorescenční barvou (**GS** - „Gel-stain“) do jamky v pravém horním rohu čipu, která je označena **GS** a zvýrazněna tmavě modrým podkladem. Tato jamka (tzv. „Gel priming well“) slouží k zavedení gelu do systému mikrokanálek čipu. Po skončení pipetování se provede vizuální kontrola jamky **GS** a pokud byla při nanášení gelu vytvořena bublina, je nutné ji odstranit.
- 2) Vložit čip do stanice pro zavádění gelu do mikrofluidních kanálek čipu tzv. „Priming station“.
- 3) Na stanici nastavit tlak **B** a čas **3**. Po zmáčknutím tlačítka **Start** začne zařízení pracovat.
- 4) Iniciací čipu trvá 60 vteřin - je ukončeno zvukovým signálem a na displeji se objeví zpráva „Ready“.
- 5) Po vyjmutí čipu je možné zkontrolovat, zda proces zavedení gelu do kanálek čipu proběhl správně – mikrokanálky, které jsou u nového čipu na spodní straně zřetelné, jsou v této fázi přípravy čipu obtížně viditelné.
- 6) Z jamky **GS** odstranit odpipetováním přebytečný gel.
- 7) Do všech jamek s označením **GS** aplikovat 12  $\mu$ l filtrovaného gelu s fluorescenční barvou („Gel-stain solution“), a to včetně jamky, která v předchozím kroku zajišťovala primární přípravu čipu.
- 8) Aplikovat 12  $\mu$ l gelu („Gel solution“) do jamky s označením **G**.
- 9) Vzorky připravené dle výše uvedeného postupu jsou v objemu 6  $\mu$ l aplikovány do jamek s označením 1 - 10. Žádná z jamek určená pro vzorky nesmí zůstat prázdná.
- 10) Do jamky s označením **L** aplikovat 6  $\mu$ l hmotnostního markeru („Pro260 ladder“).

- 11) Zkontrolovat, zda při aplikaci vzorků a hmotnostního markeru nedošlo k vytvoření bublin a případně provést opravu.
- 12) Vložit čip do aktivní elektroforetické stanice („Automated Electrophoretic Station“).
- 13) Zkontrolovat správné usazení čipu a opatrně zavřít víko elektroforetické stanice.

Pozn.: Při aplikaci gelových roztoků (GS, G), hmotnostního markeru a vzorků do čipu nutno vložit špičku pipety vertikálně na dno jamky a nevytlačovat vzduch ze špičky na konci pipetování. Umístění pipetovací špičky na roh jamky nebo stečení pipetované kapaliny po stěně jamky může vést k vytvoření bublin na dně jamky. Přijatelné jsou 1-2 malé bublinky na povrchu. Případné větší bubliny vypudit ze dna čistou pipetovací špičkou.

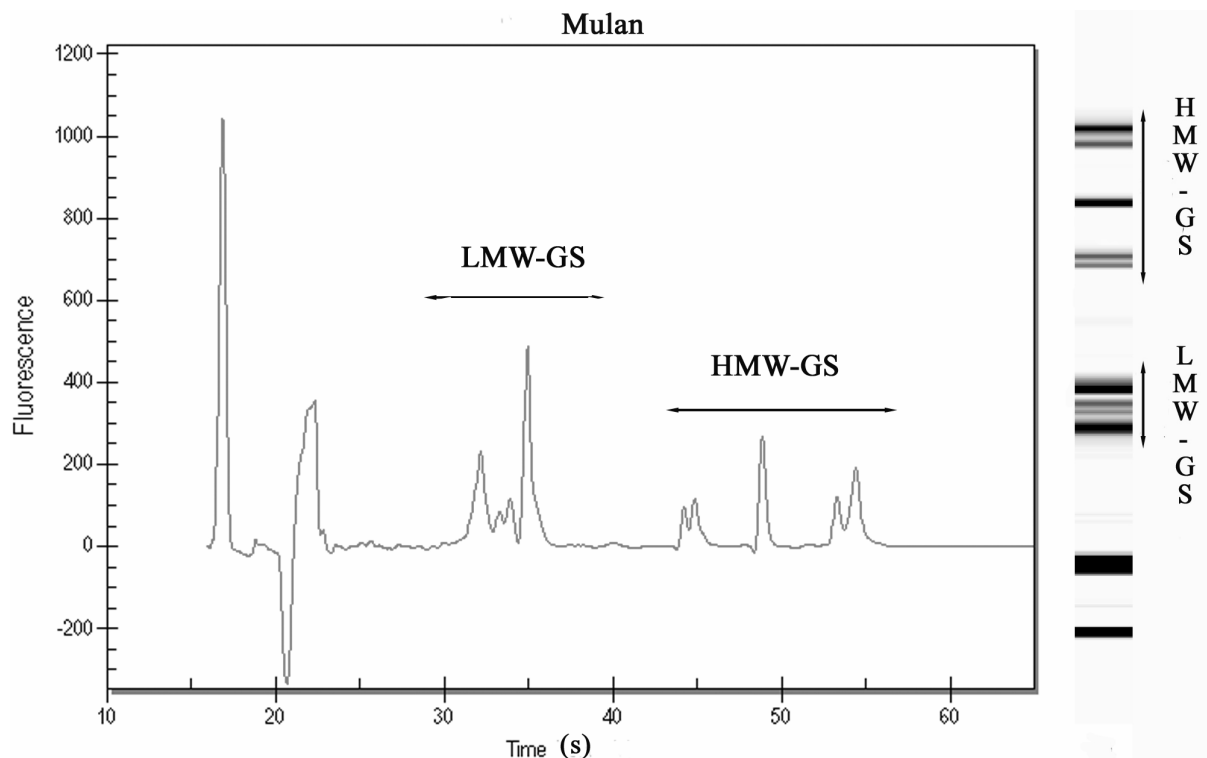
### 3.3.2.6. Provedení analýzy vzorků

- 1) Zapnout elektroforetickou stanici Experion stiskem zeleného tlačítka ve středu předního panelu. Trvale zeleně svítící kontrolka nad tlačítkem signalizuje, že přístroj je zapnutý.
- 2) Spustit software Experion.
- 3) Před spuštěním vlastní analýzy zkontrolovat komunikaci mezi ovládacím softwarem a elektroforetickou stanicí (na dolní liště v pravém rohu se objeví zelené kolečko).
- 4) K zahájení vlastní analýzy a kontrole průběhu analýzy slouží specializovaný software („Experion software“).
- 5) Po spuštění tohoto softwaru zvolit novou analýzu pomocí příkazu **New Run**.
- 6) Na obrazovce se poté objeví dialogové okno - ve výběru je nutno zvolit typ analýzy („Assay: Protein260“), pro snazší orientaci je možné pojmenovat projekt, ke kterému analýza přísluší a samozřejmě označit vlastní analýzu. Součástí dialogového okna je tabulka vzorků (*Sample 1 - Sample 10*) – zde je možné pojmenovat analyzované vzorky.
- 7) Zadat příkaz **Start** a analýza je zahájena. V průběhu analýzy musí v pravém dolním rohu blikat již zmíněné (viz bod 3) zelené kolečko. Konec analýzy je ohlášen žádostí o vyjmutí čipu z elektroforetické stanice.
- 8) Opatrně otevřít víko stanice a vyjmout čip. Po každé proběhlé analýze je nutné vyčistit elektrody pomocí čistícího čipu, který je součástí každého analytického kitu.
- 9) Do čistícího čipu aplikovat 800 µl Experion DEPC-Treated Water a tento čip vložit do stanice na místo analytického čipu.
- 10) Víko stanice zavřít a elektrody ponechat v Experion DEPC-Treated Water přibližně 60 vteřin. Poté víko stanice otevřít a elektrody ponechat cca 60 vteřin oschnout.

## 3.4. Vyhodnocení experimentálních dat z čipové elektroforézy a jejich interpretace

Součástí automatické čipové elektroforézy je počítačové zpracování získaných dat do formy grafického záznamu průběhu analýzy v podobě píků detekovaných bílkovin či simulovaného elektroforetického gelového spektra (tzv. virtuálního gelu). Výsledkem je rovněž tabulka, ve které jsou migrační časy detekovaných bílkovin a jejich molekulové hmotnosti. Systém také nabízí automatickou relativní a absolutní kvantifikaci detekovaných bílkovin.

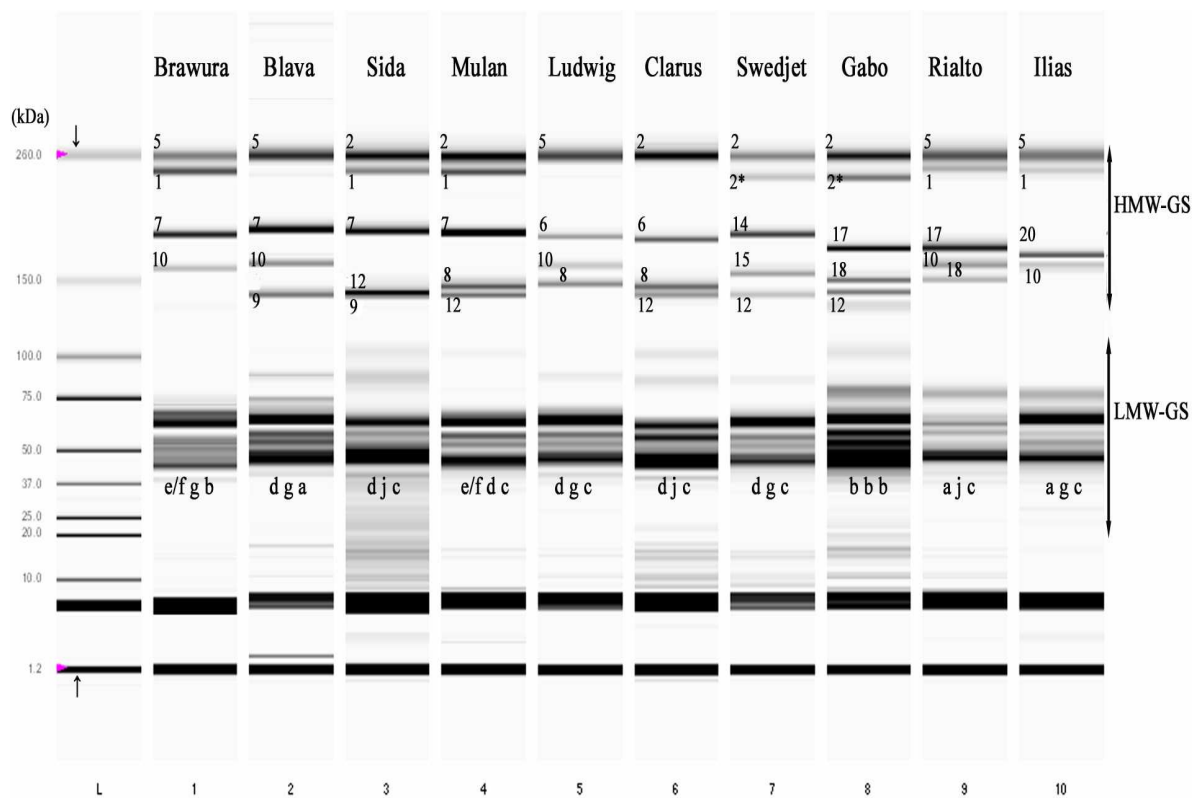
Čipová elektroforéza poskytuje formou virtuálního gelu výsledky podobné klasické gelové elektroforéze (SDS PAGE), kde se HMW- a LMW-GS jeví jako dvě rozdílné skupiny elektroforetických pruhů rozdělených podle jejich molekulových hmotností. Dvě navzájem odlišné skupiny pro HMW- a LMW-GS lze rozeznat i v případě elektroforeogramů v podobě píků (Obrázek 5).



**Obrázek 5:** Znázornění HMW- a LMW- GS odrůdy Mulan na grafických výstupech řídicího a vyhodnocovacího softwaru Experion.

### Identifikace HMW-GS

- 1) Identifikace jednotlivých gluteninových podjednotek byla prováděna na modelových odrůdách pšenice se známým alelickým složením (Tabulka 7).
- 2) Identifikaci HMW-GS u čipové elektroforézy je vhodnější provádět pomocí virtuálního gelu (v případě potřeby lze lépe porovnávat s klasickou SDS PAGE).
- 3) Sekvence HMW-GS na virtuálním gelu není přesně podle skutečné velikosti molekuly jednotlivých podjednotek a neodpovídá sekvenci podjednotek v SDS PAGE gelu.
- 4) Jednotlivé gluteninové podjednotky jsou označeny ve virtuálním gelu čísly, která jsou běžná pro klasickou SDS PAGE (Obrázek 6, Tabulka 7).
- 5) Pořadí HMW-gluteninových podjednotek na virtuálním gelu od startu je 2 = 5, 1, 2\*, 7, 14, 6, 17, 20, 10, 15, 18, 8, 12 a 9 (Obrázek 6).
- 6) HMW-GS jsou charakterizovány molekulovými hmotnostmi, které vypočítá software na základě hmotnostního markeru (Tabulka 8).
- 7) Podobně jako v případě klasické SDS PAGE, je i zde výhoda, že některé podjednotky se vyskytují v párech (5+10, 2+12, 17+18, a pod.). Týká se to hlavně podjednotek 2 a 5, které se vyskytují v pozici horního hmotnostního markeru (260 kDa) a nelze je vzájemně rozlišit, zatímco podjednotku 10 lze jednoduše rozlišit od podjednotky 12; tudíž stanovení 5+10 (*Glu-D1d*) a 2+12 (*Glu-D1a*) může být jednoznačně provedeno (Obrázek 6).
- 8) Doporučuje se do každého čipu k analyzovaným odrůdám zařadit standard se známým složením HMW-GS alel, což značně usnadní identifikaci jednotlivých gluteninových alel (viz. SDS PAGE).
- 9) Na obrázku 6 je vyznačena u modelových odrůd pšenice většina běžně se vyskytujících HMW gluteninových podjednotek. V tabulce 7 jsou gluteninové charakteristiky pro jednotlivé odrůdy sumarizovány.



**Obrázek 6:** Označení HMW- a LMW- gluteninových podjednotek na virtuálním gelu z čipové elektroforézy (HMW-GS jsou označeny čísly; LMW-GS písmeny). L – hmotnostní marker (Ladder - řebříček molekulových hmotností; symboly ↓↑ označují polohu horního (upper marker) a dolního (lower marker) hmotnostního markeru.

**Tabulka 7:** Alelické složení HMW-GS a LMW-GS modelových odrůd pšenice uvedených na obrázku 6.

Číslo dráhy	Název odrůdy	HMW-GS			LMW-GS		
		<i>Glu - A1</i>	<i>Glu - B1</i>	<i>Glu - D1</i>	<i>Glu - A3</i>	<i>Glu - B3</i>	<i>Glu - D3</i>
1	Bravura	<b>a</b> (1)	<b>a</b> (7)	<b>d</b> (5+10)	<b>e/f</b>	<b>g</b>	<b>b</b>
2	Blava	<b>c</b> (0)	<b>c</b> (7+9)	<b>d</b> (5+10)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>a</b>
3	Sida	<b>a</b> (1)	<b>c</b> (7+9)	<b>a</b> (2+12)	<b>d</b>	<b>j</b>	<b>c</b>
4	Mulan	<b>a</b> (1)	<b>b</b> (7+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>e/f</b>	<b>d</b>	<b>c</b>
5	Ludwig	<b>c</b> (0)	<b>d</b> (6+8)	<b>d</b> (5+10)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>c</b>
6	Clarus	<b>c</b> (0)	<b>d</b> (6+8)	<b>a</b> (2+12)	<b>d</b>	<b>j</b>	<b>c</b>
7	Swedjet	<b>c</b> (0)	<b>h</b> (14+15)	<b>a</b> (2+12)	<b>d</b>	<b>g</b>	<b>c</b>
8	Gabo	<b>b</b> (2*)	<b>i</b> (17+18)	<b>a</b> (2+12)	<b>b</b>	<b>b</b>	<b>b</b>
9	Rialto	<b>a</b> (1)	<b>i</b> (17+18)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>j</b>	<b>c</b>
10	Ilias	<b>a</b> (1)	<b>e</b> (20)	<b>d</b> (5+10)	<b>a</b>	<b>g</b>	<b>c</b>



**Tabulka 8:** Vypočtené molekulové hmotnosti jednotlivých HMW-GS získaných čipovou elektroforézou

HMW-GS	Molekulová hmotnost kDa
<b><i>Glu-A1</i></b>	
1	249
2*	241
<b><i>Glu-B1</i></b>	
6	188
7	196,5
8	148
9	141
14	193
15	157
17	180
18	151
20	174,5
<b><i>Glu-D1</i></b>	
2	260
12	143
5	260
10	165,5

### Identifikace LMW-GS

LMW-gluteninové podjednotky jsou v porovnání s HMW-GS velmi obtížně identifikovatelné. Obtížnost je spojena s velkým počtem konkrétních podjednotek, které se vzájemně překrývají, tudíž jednotlivé LMW-GS nelze spolehlivě identifikovat pomocí čipové elektroforézy (Obrázek 6), (Uthayakumaran et al., 2006).

## **4. Skladba podjednotek gluteninů a jejich využití pro predikci pekařské kvality pšenice**

Genetický potenciál odrůd pro pekařskou kvalitu pšenice je posuzován po řadu let s využitím tzv. *Glu-1* skóre, což je bodové ohodnocení jednotlivých nebo párů gluteninových podjednotek s HMW podle toho, jaký mají efekt na výslednou pekařskou kvalitu (vyšší hodnota predikuje lepší pekařskou kvalitu). Systém tohoto hodnocení byl vyvinut Paynem et al. (1987) na základě složení HMW-GS a SDS sedimentačního testu, jehož výsledky mají úzký vztah k pekařské kvalitě. Cornich et al. (2005b) tento systém poněkud inovovali na základě dalších kvalitativních parametrů pšenice (např. reologických vlastností) a doplnili o bodové hodnocení některých dalších podjednotek (14+15, 20), (Tabulka 9).

**Tabulka 9:** *Glu-1* skóre přiřazené jednotlivým nebo párům HMW-GS

Skóre	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
4	-	-	5+10
3	1; 2*	17+18; 7+8; 7+9; 13+16; 14+15	-
2	-	-	2+12; 3+12
1	Null	7; 6+8; 20	4+12

Pokud odrůda obsahuje žitnou translokaci T1BL.1RS, dochází ve většině případů ke snížení pekařské kvality. Aby byla predikce pekařské kvality přesnější, je nutno *Glu-1* skóre v případě přítomnosti žitné translokace upravit následujícím způsobem. *Glu-1* skóre odrůd mezi 8 a 10 se snižuje o tři body, *Glu-1* skóre mezi 5 a 7 se snižuje o 2 body a jeden bod se odečte, pokud je *Glu-1* skóre mezi 3 a 4.

Pro LMW-GS podobný systém bodového hodnocení jednotlivých podjednotek či alel ve vztahu k pekařské kvalitě v současné době neexistuje. Poznatky výzkumníků se v této oblasti do jisté míry rozcházejí (Cornish et al. 2005). V tabulce 10 je uveden model hodnocení efektu jednotlivých LMW-GS alel na některé kvalitativní parametry navržený Branlardem et al. (2001), podle kterého lze orientačně odrůdy pšenice hodnotit z hlediska předpokládané pekařské kvality.

**Tabulka 10:** Porovnání efektu jednotlivých LMW-GS alel na reologické hodnoty a hodnoty Zeleného testu.

Lokus	Pevnost lepku	Tažnost lepku	Zeleného test
<i>Glu-A3</i>	$a = d = f \geq e$	$d = a = f \geq e$	$d \geq a \geq f \geq e$
<i>Glu-B3</i>	$b' \geq d = c = b = g > i > f \geq j$	$i \geq b' \geq c = g > b = f = d > j$	$b' = d = b = i = g = c > f > j$
<i>Glu-D3</i>	$a \geq b = d = c$	sn	sn

sn: statisticky neprůkazné rozdíly

## 5. Závěr

Metodika uvádí dva analytické postupy pro charakterizaci gluteninové frakce zásobních bílkovin, které mají významný vztah k pekařské kvalitě pšenice. V případě metody čipové elektroforézy vyvinuté v posledních letech dochází na rozdíl od klasické elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) k časové úspoře. Riziko manipulace s toxickými chemikáliemi je omezeno na minimum a je rovněž minimalizován vliv lidského faktoru. SDS PAGE se však vyznačuje menší ekonomickou náročností a umožňuje rozlišení jednotlivých LMW-GS alel.

### III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V České republice nebyla dosud zpracována komplexní metodika, která by současně zahrnovala hodnocení jak vysokomolekulárních (HMW-GS) tak i nízkomolekulárních podjednotek gluteninů (LMW-GS). Předložená metodika „*Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice*“ obsahuje podrobné pracovní postupy klasické elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE) a moderní čipové elektroforézy pro identifikaci obou typů gluteninů. Metodika zahrnuje katalog HMW-gluteninových alel a LMW-gluteninových alel, který nebyl doposud v ČR k dispozici a přehledně popisuje postup jejich identifikace na modelových odrůdách pšenice. Metodika zároveň poskytuje nejnovější informace o vztahu gluteninů k pekařské kvalitě a schopnosti predikovat tuto významnou vlastnost pšenice.

### IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika shrnující nové poznatky v oblasti zásobních bílkovin pšenice bude poskytnuta široké odborné veřejnosti, která se touto problematikou zabývá. Budoucími uživateli metodiky jsou univerzity, orgány státní kontroly, výzkumná a šlechtitelská pracoviště. Metodika může být efektivně uplatněna ve šlechtitelských programech při hodnocení šlechtitelských materiálů a k urychlení i monitorování procesu tvorby nových odrůd. Metodika najde rovněž uplatnění při charakterizaci genových zdrojů na pracovištích zabývajících se genofondy pšenice.

### V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Čipová elektroforéza na rozdíl od klasické gelové elektroforézy (SDS PAGE) představuje z ekonomického hlediska cca 3x vyšší pořizovací náklady na aparaturu i mnohem vyšší náklady na spotřební materiál (Tabulka 11). Jedná se však o kvalitativně vyšší úroveň analýzy jak z hlediska úspory času a pracnosti, objektivnosti výsledků, tak i bezpečnosti práce.

**Tabulka 11.** Informativní porovnání nákladů na analýzu gluteninů v zrně pšenice metodou SDS PAGE a čipovou elektroforézou

SDS PAGE		Čipová elektroforéza	
1 analýza (2 gely, 30 zrn)	Kč	1 analýza (1 čip, 10 zrn)	Kč
Materiál s DPH (20%)	<b>156,00</b>	Materiál s DPH (20%)	<b>1092,00</b>
Mzda (14 hod.; 150,00 Kč/hod.)	<b>2100,00</b>	Mzda (3 hod.; 150,00 Kč/hod.)	<b>450,00</b>
Režie pracoviště (cca 29% celk. nákl.)	<b>902,00</b>	Režie pracoviště (cca 29% celk. nákl.)	<b>615,00</b>
Celkové náklady na 30 zrn	<b>3158,00</b>	Celkové náklady na 10 zrn	<b>2157,00</b>
Náklady na 1 zrno (zaokrouhлено)	<b>105,00</b>	Náklady na 1 zrno (zaokrouhлено)	<b>216,00</b>

Pozn.: V nákladech není zahrnuta amortizace přístrojů.

Obě metody významně přispějí k efektivitě a racionalizaci šlechtitelského procesu tvorby moderních odrůd pšenice. Ekonomickou efektivitu lze především spatřovat v možnosti selekce pšeničných materiálů již v raných generacích, což vede k urychlení šlechtitelského procesu a tím i úspoře provozních nákladů na vedení a hodnocení polních experimentů.

## V. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Branlard G., Dardevet M., Amiour N., Igrejas G. (2003): Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetic resources and Crop Evolution*, 50: 669–679.

Branlard G., Dardevet M., Saccomano R., Lagoutte F., Gourdon J. (2001): Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119: 59-67.

Cornish, G.B., Békés, F., Eagles, H.A., Payne, P.I. (2005): Prediction of dough properties for bread wheats. In *Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Quality*. Amer. Assoc. Cereal Chemists, St Paul, MN, USA. Pages 243-280.

Payne P.I., Lawrence G.J. (1983): Catalogue of alleles or the complex loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which coded for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications*, 11: 29–35.

Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt L.M. (1987): The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread making quality of british-grown wheat varieties. *Journal Science Food and Agriculture*, 40: 51–65.

Uthayakumaran S., Listiohadi Y., Baratta M., Batey I.L., Wrigley C.W. (2006): Rapid identification and quantitation of high-molecular-weight glutenin subunits. *Journal of Cereal Science*, 44: 34-39.

## VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Bradová J., Matějová E. (2008): Comparison of the results of SDS PAGE and chip electrophoresis of wheat storage proteins, *Chromatographia* 67: 83-88

Bradová J., Štočková L. (2010): Evaluation of winter wheat collection in term of HMW- and LMW- glutenin subunits. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 46: 96-99.

Autoři: Ing. Jana Bradová  
Ing. Václav Dvořáček, PhD.  
Ing. Lenka Štočková

Název: Využití gelové a čipové elektroforézy pro identifikaci podjednotek gluteninů s vysokou a nízkou molekulovou hmotností u pšenice

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Sazba a tisk: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

Náklad: 50 ks

Vyšlo v roce 2011

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: bradova@vurv.cz  
dvoracek@vurv.cz  
stockova@vurv.cz

Autor fotografií: Lenka Štočková

©Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2011

ISBN 978-80-7427-056-7