

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matej ŠUŠTARŠIČ

**UVEDBA LUMINISCENČNE METODE ZA MERJENJE
VODIKOVEGA PEROKSIDA V ZDRAVIH IN OKUŽENIH LISTIH
KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INTRODUCTION OF LUMINESCENCE METHOD FOR
QUANTIFICATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN HEALTHY AND
INFECTED POTATO LEAVES (*Solanum tuberosum* L.)**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Študijska komisija dodiplomskega študija je na seji dne 22. 5. 2007 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Kovač, za somentorja dr. Alexisa Zrimca in za recenzentko prof.dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marina Dermastia
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo in Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Maja Kovač
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: dr. Alexis Zrimec
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.

Član: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 4. 2. 2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je diplomsko delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Matej Šuštaršič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 581.2:535.37:582.951(043.2)=163.6
KG virusi/PVY/vodikov peroksid/luminol/luminiscenca/čitalac mikrotiterskih ploščic
AV ŠUŠTARŠIČ, Matej
SA KOVAČ, Maja (mentor)/ZRIMEC, Alexis (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2008
IN UVEDBA LUMINISCENČNE METODE ZA MERJENJE VODIKOVEGA PEROKSIDA V ZDRAVIH IN OKUŽENIH LISTIH KROMPIRJA (*Solanum tuberosum* L.)
TD diplomska naloga (univerzitetni študij)
OP XIII, 73 str., 13 pregl., 21 sl., 2 pril., 48 vir
IJ sl
JI sl / en
AI Luminiscenčne metode so vsestransko uporabne zaradi nizke cene reagentov in visoke občutljivosti. Uporabljajo se tudi za merjenje koncentracije vodikovega peroksida (H_2O_2) v rastlinah. Namen naloge je bil prilagoditi najpogosteje uporabljano kivetno luminiscenčno metodo za uporabo čitalca mikrotiterskih ploščic in jo nadalje uporabiti za analizo rastlinskega materiala. Opazili smo, da na rezultat luminiscenčne metode vplivajo številni dejavniki, kot so temperatura, pH, koncentracije dušilcev v rastlinskem materialu ter celo centrifugiranje. Zaradi hitrega upada luminiscence je ključnega pomena tudi čas po dodatku fericianida do pričetka merjenja luminiscence. Pokazali smo, da je upad luminiscence višji v rastlinskem materialu kot pri H_2O_2 (standard), vendar tudi upad luminiscence standarda ni konstanten in je pogojen s koncentracijo H_2O_2 . Z uporabo čitalca mikrotiterskih ploščic lahko analiziramo do 96 vzorcev hkrati, vendar pa je ob upoštevanju upada luminiscence optimalno število analiziranih vzorcev 4. Analizirali smo kontrolne (K), slepo inokulirane (S) in s krompirjevim virusom Y (Y) okužene liste krompirja občutljive sorte 'Igor' v petih časovnih točkah po inokulaciji. Rezultati kažejo, da bazalne koncentracije H_2O_2 znašajo do 146 nmol/g sveže mase. Pokazali smo, da so koncentracije H_2O_2 pri Y v začetnih fazah po okužbi (1 h) višje od S in K, vendar se 3 h po inokulaciji to nekoliko spremeni, saj ima S 6 h po inokulaciji višjo koncentracijo H_2O_2 v primerjavi z Y, a nižjo od K.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 581.2:535.37:582.951(043.2)=163.6
 CX viruses/hydrogen peroxide/luminol/luminescence/microplate reader
 AU ŠUŠTARŠIČ, Matej
 AA KOVAČ, Maja (supervisor)/ ZRIMEC, Alexis (co-supervisor)
 PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
 PY 2008
 TI INTRODUCTION OF LUMINESCENCE METHOD FOR QUANTIFICATION OF HYDROGEN PEROXIDE IN HEALTHY AND INFECTED POTATO LEAVES (*Solanum tuberosum* L.)
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO XIII, 73 p., 13 tab., 21 fig., 2 epp., 48 ref.
 LA sl
 AL sl / en
 AB Due to low reagents costs and high sensitivity luminescence methods are widely used. The luminescence method is also used for quantification of hydrogen peroxide (H₂O₂) in plants. The aim of our work was to modify the most frequently used kivet method to use it with microplate reader. Modified method was used to analyze plant material. We found that the results of luminescence method are influenced by several factors, such as temperature, pH, concentrations of quenchers in plant material and even centrifugation. Luminescence decreases rapidly, so the most important factor is the time between the addition of ferriion and the start of measurement. We demonstrated that luminescence decrease in plant material was higher in comparison to H₂O₂ (standard), but standards with different concentrations of H₂O₂ did not show the equal decrease. When using microplate reader you can analyze up to 96 samples at the same time, but if you take in count the decrease of luminescence the optimal number of analysed samples is 4. We analysed intact (K), blindly inoculated (S) and with PVY infected (Y) leaves of susceptible cultivar 'Igor' in five time points after inoculation. Our data shows that concentrations of H₂O₂ in intact leaves go up to 146 nmol/g fresh weight. The concentrations of H₂O₂ are higher in the earlier stages (1 h post inoculation) in Y leaves in comparison to S and K, but after 3 h post inoculation that changes and 6 h after inoculation S have higher concentrations of H₂O₂ in comparison to Y, but still lower than K.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|---|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija | III |
| Key words documentation | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | VIII |
| Kazalo slik | X |
| Kazalo prilog | XII |
| Seznam okrajšav in simbolov | XIII |
| | |
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 Utemeljitev predlagane raziskave | 1 |
| 1.2 Delovne hipoteze | 1 |
| 1.3 Namen dela..... | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV..... | 3 |
| 2.1 Razhudnikovke (<i>Solanaceae</i>)..... | 3 |
| 2.1.1 Razhudnik (<i>Solanum</i>) | 3 |
| 2.2 Krompirjev virus PVY..... | 4 |
| 2.3 ROS (Reactive Oxygen Species) - reaktivne kisikove spojine | 4 |
| 2.4 Obrambni mehanizmi proti oksidativnemu stresu..... | 5 |
| 2.4.1 Antioksidativni encimi..... | 6 |
| 2.4.2 Nizkomolekularni antioksidanti (LMWA) | 6 |
| 2.5 Vodikov peroksid v rastlinah | 8 |
| 2.5.1 Vloga H ₂ O ₂ v rastlinah | 8 |
| 2.5.2 Peroksidaze (PX) | 13 |
| 2.6 Luminiscenčne metode detekcije vodikovega peroksida | 13 |
| 2.6.1 Luminiscenčne metode | 14 |
| 2.6.2 Uporaba polivinilpirolidona (PVP) za odstranitev fenolnih spojin..... | 15 |
| 2.6.3 Vpliv dušenja luminiscence..... | 15 |
| 2.6.4 Vpliv pH vrednosti na luminiscenco..... | 15 |
| 2.7 Ostale metode detekcije vodikovega peroksida | 15 |
| 2.7.1 Metoda z 2',7' diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA) | 16 |
| 2.7.2 Amplex Red..... | 16 |
| 2.7.3 Histokemijska detekcija H ₂ O ₂ z odtisom rastlinskega materiala »tissue printing«..... | 16 |
| 3 MATERIAL IN METODE..... | 18 |
| 3.1 Priprava rastlinskega materiala..... | 18 |
| 3.1.1 Priprava poskusnih rastlin..... | 18 |
| 3.1.2 Inokulacija rastlin | 18 |
| 3.1.3 Pobiranje in shranjevanje rastlinskega materiala | 19 |
| 3.2 Ekstrakcija, čiščenje in merjenje vodikovega peroksida rastlinskega materiala | 20 |
| 3.2.1 Ekstrakcija | 20 |
| 3.2.2 Čiščenje rastlinskega materiala..... | 21 |
| 3.2.3 Merjenje luminiscence..... | 22 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.2.4 | Izkoristek | 23 |
| 3.2.5 | Čiščenje mikrotiterskih ploščic..... | 23 |
| 3.3 | Aktivacija in regeneracija DEAE Sephadex A-25..... | 24 |
| 3.3.1 | Aktivacija DEAE Sephadex A-25 | 24 |
| 3.3.2 | Regeneracija DEAE Sephadex A-25 | 24 |
| 3.4 | Obdelava rezultatov meritev luminiscence | 24 |
| 3.4.1 | Izračun luminiscence v času 0 s..... | 24 |
| 3.4.2 | Izračun ploščin..... | 25 |
| 3.4.3 | Izračun umeritvene krivulje in določitev koncentracije H ₂ O ₂ v vzorcu..... | 26 |
| 3.4.4 | Izračun količine vodikovega peroksida na gram rastlinskega materiala..... | 27 |
| 4 | REZULTATI..... | 29 |
| 4.1 | Vpliv najpomembnejših dejavnikov na rezultat meritve..... | 29 |
| 4.2 | Optimizacija postopka ekstrakcije | 30 |
| 4.2.1 | Centrifugiranje..... | 30 |
| 4.2.2 | Volumen elucije..... | 30 |
| 4.3 | Luminiscenca | 31 |
| 4.3.1 | Luminiscenca kemikalij z in brez K ₃ Fe(CN) ₆ | 31 |
| 4.3.2 | Primerjava luminiscence oetne kisline in 5 % TCA..... | 31 |
| 4.3.3 | Vpliv redčenja rastlinskega materiala | 31 |
| 4.3.4 | Uporaba založne raztopine amonijevega hidroksida in luminola | 32 |
| 4.4 | Upad luminiscence..... | 32 |
| 4.4.1 | Standard..... | 32 |
| 4.4.2 | Rastlinski material | 33 |
| 4.4.3 | Vpliv čiščenja rastlinskega materiala na luminiscenco..... | 34 |
| 4.5 | Uporaba večkanalne pipete | 35 |
| 4.6 | Dodatek encima askorbat oksidaze ekstraktu | 36 |
| 4.6.1 | Obstojnost encimske raztopine | 36 |
| 4.6.2 | Vpliv pH in askorbat oksidaze na luminiscenco | 36 |
| 4.6.3 | Kemikalije in pH | 37 |
| 4.6.4 | Primerjava umeritvene krivulje standarda v NH ₄ OH in vodi | 38 |
| 4.7 | Uporaba različnih metod čiščenja ekstrakta..... | 38 |
| 4.8 | Optimizacija merjenja luminiscence | 39 |
| 4.8.1 | Vpliv stresanja in volumen fericianida | 39 |
| 4.8.2 | Določitev najoptimalnejših nastavitvev aparature | 40 |
| 4.8.3 | Določitev časa merjenja..... | 40 |
| 4.9 | Pregled in izbira metode obdelave podatkov | 42 |
| 4.10 | Povzetek razmer za merjenje luminiscence H₂O₂ v rastlinskem materialu | 44 |
| 4.11 | Določitev vodikovega peroksida v rastlinskem materialu | 45 |
| 4.11.1 | Izkoristek | 45 |
| 4.11.2 | Pregled manjšanja jakosti luminiscence slepega vzorca..... | 47 |
| 4.11.3 | H ₂ O ₂ v rastlinah..... | 47 |
| 5 | RAZPRAVA | 51 |
| 5.1 | Razprava | 51 |
| 5.1.1 | Vpliv najpomembnejših dejavnikov na rezultat meritve | 51 |
| 5.1.2 | Optimizacija postopka ekstrakcije | 51 |
| 5.1.3 | Luminiscenca..... | 52 |
| 5.1.4 | Upad luminiscence..... | 53 |

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.1.5 | Uporaba večkanalne pipete | 55 |
| 5.1.6 | Dodatek encima askorbat oksidaze ekstraktu | 55 |
| 5.1.7 | Kemikalije in pH | 56 |
| 5.1.8 | Uporaba različnih metod čiščenja ekstrakta..... | 57 |
| 5.1.9 | Optimizacija merjenja luminiscence..... | 58 |
| 5.1.10 | Pregled in izbira metode obdelave podatkov | 60 |
| 5.1.11 | Meritev koncentracije vodikovega peroksida v rastlinskem materialu..... | 61 |
| 5.2 | SKLEPI | 67 |
| 6 | POVZETEK | 68 |
| 7 | Viri..... | 70 |

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|---|------|
| Preglednica 1: Primerjava srednje vrednosti luminiscence (v RLU) očetne in trikloroacetne kisline. Luminiscenca je prikazana kot seštevek štirih ciklov. $^1(N = 4) \pm S.E.$, $^2(N = 5) \pm S.E.$ | 31 |
| Preglednica 2 Upad luminiscence standarda različnih koncentracij H ₂ O ₂ . Merjeno v dveh različnih časovnih točkah. Prva meritev opravljena po dodatku fericianida in druga meritev po 16,3 minutah po koncu prve..... | 33 |
| Preglednica 3 Luminiscenca eluata pH 6 in 1 v primerjavi z eluatom pH 6 inkubiranim z encimom. Luminiscenca je preračunana na čas prve meritve in izražena v RLU..... | 36 |
| Preglednica 4 Luminiscenca slepega vzorca (ddH ₂ O) in eluata rastlinskega vzorca s popravljeno vrednostjo pH na 6,13 in 9,5. Luminiscenca je preračunana na čas prve meritve in predstavljena kot srednja vrednost treh meritev istega eluata s standardno napako..... | 37 |
| Preglednica 5 pH vrednosti posameznih kemikalij in reakcijske mešanice merjene v sorazmerni raztopini posameznih kemikalij reakcijske mešanice..... | 38 |
| Preglednica 6 Luminiscenca izražena v RLU različno čistega rastlinskega vzorca (N = 3) $\pm S.E.$ Luminiscenca je prikazana kot seštevek 4 ciklov..... | 39 |
| Preglednica 7 Prikaz dolžine cikla (kinetični interval) v sekundah pri merjenju različnega števila luknjic..... | 41 |
| Preglednica 8 Pregled nihanja časovnih točk ('Time points') 4 vzorcev merjenih v 6-ih ciklih..... | 41 |
| Preglednica 9 Pregled povprečnih časovnih intervalov do stresanja treh meritev (N=3) $\pm S.E.$ | 42 |
| Preglednica 10 Povzetek rezultatov različne obdelave istih podatkov (N=3) $\pm S.E.$ Metoda primerjave prve meritve prvega cikla vzorca s prvo meritvijo prvega cikla standarda (1. metoda), metoda primerjave vsote vseh ciklov vzorca z vsoto vseh ciklov standarda (2. metoda), metoda primerjave ploščine vzorca s ploščino standarda (3. metoda), in metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s (2. metoda)..... | 43 |

| | | |
|----------------|---|----|
| Preglednica 11 | Pregled luminiscence H ₂ O ₂ pripravljenega v 5% nevtralizirani TCA s pH 6.46 in H ₂ O ₂ pripravljenega v ddH ₂ O. V oklepaju so odštete povprečne vrednosti luminiscence vode..... | 45 |
| Preglednica 12 | Pregled izmerjenih vrednosti luminiscence umeritvene krivulje, slepega vzorca (SV) in rastlinskega materiala kontrolne skupine (K), slepo inokulirane skupine (S) in okužene skupine (Y). Za SV (N > 8) ± S.E., * ¹ (N = 8) ± S.E. Za K, S, Y in umeritveno krivuljo s srednjo vrednostjo (N = 3) ± S.E., oz.* (N = 2) ± S.E..... | 48 |
| Preglednica 13 | Pregled na čas 0 s izračunanih vrednosti luminiscence umeritvene krivulje, slepega vzorca (SV) in rastlinskega materiala kontrolne skupine (K), slepo inokulirane skupine (S) in okužene skupine (Y) s srednjo vrednostjo SV (N > 8) ± S.E., in * ¹ (N = 8) ± S.E., ter (N = 3) ± S.E., oz.* (N = 2) ± S.E. za K, S, Y in vrednosti standarda..... | 48 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|----------|--|
| Slika 1 | Izvor in razgradnja H ₂ O ₂ v rastlinski celici (Neill in sod., 2002a). APX- askorbat peroksidaza, DHAR- dehidroaskorbat reduktaza, GR- glutation reduktaza 7 |
| Slika 2 | Delovanje H ₂ O ₂ kot signalne molekule (Neill in sod., 2002a) 9 |
| Slika 3 | Prikaz reakcije luminola v prisotnosti H ₂ O ₂ in katalizatorja (Warm in Laties, 1982) 14 |
| Slika 4 | Prikaz rastline občutljivega kultivarja 'Igor' 7 dni po okužbi z virusom PVY ^{NTN} (levo), ter povečava spodnjega inokuliranega lista (desno)..... 19 |
| Slika 5 | Poenostavljen prikaz obdelave rastlinskega materiala..... 21 |
| Slika 6 | Prikaz ekstrapolacije oz. izračuna luminiscence na čas 0 s v 4-ih korakih..... 25 |
| Slika 7 | Shematski prikaz načina izračuna koncentracije H ₂ O ₂ v rastlinskem materialu ... 27 |
| Slika 8 | Pregled najpomembnejših vplivov različnih dejavnikov na rezultat meritve in odnosi med njimi 29 |
| Slika 9 | Vpliv časa na upad luminiscence 10 μM H ₂ O ₂ izraženega v RLU od priprave založne raztopine luminola in amonijevega hidroksida (prva puščica). Druga puščica prikazuje vrednost luminiscence sveže odpipetiranih kemikalij. Prikazano kot seštevek 4-ih ciklov..... 32 |
| Slika 10 | Luminiscenca 1 mM H ₂ O ₂ standarda v odvisnosti od časa pričetka reakcije do meritve po dodatku katalizatorja (N = 3) ± S.E 33 |
| Slika 11 | Pregled luminiscence zadnjega (šestega) cikla, izraženega kot odstotek prvega cikla izmerjenih vrednosti luminiscence kontrolnih rastlin (K), slepo inokuliranih (S) in z virusom PVY okuženih rastlin (Y), ter slepega vzorca (SV) in standarda različne koncentracije (N = 3) ± S.E, * (N = 2) ± S.E..... 34 |
| Slika 12 | Pregled upada luminiscence različno čistega rastlinskega vzorca..... 35 |
| Slika 13 | Časovni upad pH vrednosti vode..... 37 |

| | | |
|----------|--|----|
| Slika 14 | Luminiscenca (RLU) v odvisnosti od volumna $K_3Fe(CN)_6$ | 40 |
| Slika 15 | Shematski prikaz od priprave aparature do meritve prvega vzorca..... | 44 |
| Slika 16 | Prikaz umeritvene krivulje pripravljene v vodi in v nevtralizirani 5% TCA..... | 46 |
| Slika 17 | Pregled upada meritve luminiscence slepega vzorca od 30.11 – 21.12. ($N > 5$) \pm S.E, razen * ($N=2$) \pm S.D..... | 47 |
| Slika 18 | Prikaz na čas 0 s preračunanih vrednosti luminiscence okuženih (Y), slepo inokuliranih (S) in kontrolnih rastlin (K), ter slepega vzorca (SV). Za SV ($N > 8$) \pm S.E in za K, Y, S ($N = 2$ do 3) \pm S.E | 49 |
| Slika 19 | Luminiscenca okuženih (Y) in slepo inokuliranih (S) listov z odšteto vrednostjo luminiscence kontrolnih listov (K) v času 0 s. ($N = 2$ do 3) \pm S.E. | 49 |
| Slika 20 | Srednja vrednost razmerja ploščin luminiscence slepo inokulirane in intaktne skupine (S/K) in okužene in intaktne skupine (Y/K) ($N=3$) \pm S.E, *($N=2$) \pm S.E. | 50 |
| Slika 21 | Pregled razmerja aktivnosti peroksidaz v časovnem poteku okužbe (podatki Milavec, 2004 str. 62, 64 in 67)..... | 64 |

KAZALO PRILOG

| | |
|-----------|---|
| PRILOGA A | VPLIV TEMPERATURE NA PRIČETEK MERITVE |
| PRILOGA B | PREGLED IN IZBIRA METODE OBDELAVE PODATKOV |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-------------------------------|---|
| APX | askorbat peroksidaza |
| ASC | askorbat |
| CAT | katalaza |
| ddH ₂ O | dvakrat destilirana voda |
| DEAE | dietilaminoetil |
| GPX | glutationska peroksidaza |
| GR | glutationska reduktaza |
| GSH | reducirana oblika glutaciona |
| GSSH | oksidirana oblika glutaciona |
| H ₂ O ₂ | vodikov peroksid |
| HR | hipersenzitivna reakcija |
| K | intaktne rastline |
| LMWA | nizkomolekularni antioksidanti (<u>L</u> ow <u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>A</u> ntioxidants) |
| LOX | lipoksigenaza |
| MDA | malondialdehid |
| PCD | programirana celična smrt |
| pH | negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov |
| PR | s patogenezo povezani proteini |
| PVP | polivinilpirolidon |
| PVPP | polivinilpolipirolidon |
| PVY | »potato virus <u>Y</u> « |
| PX | peroksidaza |
| RLU | relativne svetlobne enote (<u>R</u> elative <u>L</u> ight <u>U</u> nits) |
| ROS | reaktivne kisikov spojine |
| S | slepo inokulirane rastline |
| SA | salicilna kislina |
| SOD | superoksid dismutaza |
| SV | slepi vzorec |
| TCA | trikloroacetna kislina |
| TF | transkripcijski faktor |
| Y | rastline okužene s PVY |

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Luminiscenčne metode so zaradi svoje izjemne občutljivosti in cenovne ugodnosti nadvse primerne za uporabo v mnogih znanstvenih panogah in disciplinah. Njihovo uporabnost izkoriščajo znanstveniki v forenzičnih raziskavah, raziskavah voda in nenazadnje tudi v številnih bioloških raziskavah.

Uporabo luminiscenčne metode za zaznavanje vodikovega peroksida v rastlinskem materialu sta prvič predstavila Warm in Laties (1982). Opisana metoda temelji na uporabi kivetnega sistema in tako omogoča analizo le enega vzorca. Z razvojem tehnologije pa se je pojavila možnost uporabe čitalcev mikrotiterskih ploščic in tako analiza večjega števila vzorcev, kar močno olajša in pospeši delo. Kljub omenjenim prednostim pa pri luminiscenci uporabe čitalca mikrotiterskih ploščic za analizo vodikovega peroksida v rastlinskih ekstraktih nismo zasledili.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pri vpeljavi luminiscenčne metode za določanje H_2O_2 v listih krompirja pričakujemo težave pri določanju volumnov in koncentracij reagentov - zaradi občutljivosti metode in motečih snovi v rastlinskem materialu. Določili bomo optimalne pogoje kot kompromisno rešitev med uspešno ponovljivostjo, primernim signalom luminiscence in enostavno izvedbo meritve.

Pričakujemo težave pri določanju vodikovega peroksida v rastlinah, saj smo v literaturi zasledili večja odstopanja v koncentracijah le-tega. Težavam se bomo poskušali izogniti z izdatnim čiščenjem rastlinskega ekstrakta in čimbolj konstantnimi pogoji merjenja.

V s krompirjevim virusom Y (PVY^{NTN}) okuženih rastlinah občutljive sorte 'Igor' pričakujemo v začetnih fazah višjo tvorbo reaktivnih kisikovih spojin oz. merjenega vodikovega peroksida od slepo inokuliranih in kontrolnih skupin. Pričakujemo tudi, da bo koncentracija vodikovega peroksida narasla pri slepo inokuliranih rastlinah sorte 'Igor' vendar v manjši meri kot pri okuženih rastlinah.

1.3 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je:

- prilagoditi luminiscenčno metodo kivetnega sistema za uporabo čitalca mikrotiterskih ploščic za analizo večjega števila vzorcev
- ugotoviti morebitne dejavnike, ki vplivajo na zaznavanje vodikovega peroksida v rastlinah
- uporabiti metodo za analizo koncentracij H_2O_2 v listih krompirja 'Igor' in ugotoviti, kako se koncentracija H_2O_2 spreminja v listih tekom okužbe z virusom PVY^{NTN} v primerjavi z listi intaktnih oz. slepo inokuliranih rastlin

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZHUDNIKOVKE (*SOLANACEAE*)

Razhudnikovke so družina z od 2300 (Praprotnik, 2002) do 3000 vrstami (Heywood, 1995). Mednje prištevamo preko 90 rodov, ki so razširjeni po vsem svetu s središči v Avstraliji, Srednji in Južni Ameriki. Najvišje število endemnih rastlin najdemo v S in J Ameriki, od koder naj bi družina tudi izvirala (Heywood, 1995).

Družina razhudnikovk je ekonomsko pomembna družina, saj številne rodove gojijo zaradi lepega cvetja (*Browallia*, *Brufelsia*, *Datura*,...), kot grmovnice (*Cestrum*, *Lycium*, *Solanum*,...) ali kot prehransko pomembne rodove (*Solanum*, *Lycopersion*, *Capsicum*,...). (Heywood, 1995). Za človeka uporabne vrste so krompir, paprika, tobak, volčja češnja, volčje jabolko, petunija in druge (Praprotnik, 2002).

2.1.1 Razhudnik (*Solanum*)

Rod šteje okoli 1500 po vsem svetu razširjenih vrst, med katerimi mnoge vrste vsebujejo solanin (Praprotnik, 2002). Solanin je glikoalkaloid z insekticidnim delovanjem in je strupen tudi za človeka (Petauer, 1993). V rod poleg krompirja (*S. tuberosum*) uvrščamo še naslednje za človeka pomembnejše vrste: grenkoslad (*S. dulcamara*), jajčevac (*S. melongena*), pasje zelišče (*S. nigrum*) in druge (Petauer, 1993).

2.1.1.1 Krompir (*S. tuberosum* L)

Krompir so gojili že v Čilu okoli 5000 let pred našim štetjem. V Evropo pa so ga prinesli sredi 16. stoletja in ga nato razširili iz Španije še v druge evropske države. Sprva so krompir gojili kot okrasno rastlino, zaradi zastрупitev ob uživanju plodov in nadzemnih delov, ter dejstva, da se razvije iz gomolja v zemlji, kar so povezovali s hudičem, pa se krompir v večji meri ni uporabljal v prehrani vse do 18. stoletja (Petauer, 1993).

Danes krompir takoj za žiti predstavlja najvažnejšo prehransko kulturo. Poleg pomembne prehranske vloge se krompir uporablja tudi za predelavo v tehnični špirit, večje količine škroba porabijo v tekstilni, usnjarski, papirni industriji, industriji umetnih mas, lepil, pralnih praškov idr. (Petauer, 1993).

V Sloveniji je bilo do leta 1990 v Uradnem listu vpisanih preko 50 različnih sort krompirja (Sluga, 1994). Omenjeni kultivarji se razlikujejo po odpornosti do škodljivcev, po primernosti za uporabo v prehrani, lahko pa jih razdelimo tudi na zgodnje in pozne sorte (Sluga, 1994).

Kultivar 'Igor' je srednje pozna sorta z belim mesom, zelo dobro prenaša skladiščenje in dolgo ohrani jedilno vrednost. Kljub temu, da je kultivar dokaj odporen proti virusnim boleznim, je izredno občutljiv na virus Y^{NTN} (Sluga, 1994), zaradi česar je ta bolezen povzročila pridelovalcem največjo gospodarsko škodo (Kus, 1994).

2.2 KROMPIRJEV VIRUS PVY

Krompirjev virus PVY uvrščamo v družino Potyviridae. Premer partiklov znaša okoli 15 nm, njihova dolžina pa med 720 – 800 nm (cit. in Miki in Oshima, 1972). Najpogostejša prenašalka Potyvirusov je breskova uš (*Myzus persicae*). Ko uš prebode povrhajico okužene rastline, se na rilček uši prenesejo tudi virusi, ki jih nato listna uš prenese naprej (Kus, 1994).

Virus Y^{NTN} povzroča bolezen imenovano prstanasta (obročkasta) nekroza gomoljev krompirja (PTNRD). V Sloveniji so bolezen v večjem obsegu opazili leta 1988, pred tem pa se je bolezen pojavila na Madžarskem, v ZR Nemčiji, Bosni in Hercegovini, Srbiji, na Hrvaškem in v DR Nemčiji.

PVY NTN močneje zmanjšuje pridelek kot ostale različice. Pridelek je pri občutljivih sortah krompirja zaradi zmanjšane kvalitete tudi neprimeren za prodajo, česar posledica je, da je 'Igor' kot na PVY NTN občutljiva rastlina hitro izginila iz naših polj (Kus, 1994).

2.3 ROS (REACTIVE OXYGEN SPECIES) - REAKTIVNE KISIKOVE SPOJINE

Kemijsko je snov, ki lahko odda elektrone, oksidant, snov, ki elektrone sprejme, pa reducent (Kač, 2004).

Reaktivne kisikove spojine (ROS) lahko delimo na radikalno in neradikalno skupino. Radikali so snovi, ki vsebujejo vsaj en nesparjen elektron na lupinah okoli jedra. Njihova visoka reaktivnost je posledica nesparjenega elektrona (Kač, 2004). Radikalna skupina, imenovana tudi prosti radikali, vsebuje dušikov oksidni radikal ($NO\cdot$), superoksidni ionski

radikal (O_2^{\cdot}), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni radikal (ROO^{\cdot}), alkoksilni radikal (RO^{\cdot}) in singletni kisik (1O_2) (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

Neradikalna skupina pa je sestavljena iz bolj variabilnih spojin, nekaterih s prav tako visoko reaktivnostjo kot v primeru radikalov. Sem uvrščamo tudi vodikov peroksid (povzeto po Bienert in sod., 2006).

Reaktivne kisikove spojine nastajajo v celicah ves čas. Celice so tekom evolucije razvile številne mehanizme, ki odstranjujejo nevarne ROS oz. jih pretvarjajo v celicam manj nevarne snovi (povzeto po Kohen in Nyska, 2002; Baker in Orlandi, 1999).

Superoksidni ionski radikal ($O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$) je nenavaden v tem, da lahko v celici deluje kot oksidant in reagira s spojinami, ki imajo sposobnost doniranja H^+ (askorbat, tokoferol), po drugi strani pa deluje tudi kot reducent (povzeto po Kohen in Nyska, 2002). V rastlinskih celicah se lahko tvori preko membransko vezane NADPH-oksidade/sintaze, peroksidaz celične stene, lipoksigenaze (LOX) in kot posledica nepravilnega prehoda elektronov v mitohondrijih in kloroplastih (povzeto po Neill in sod., 2002a; Kohen in Nyska, 2002). Pri odstranjevanju se superoksid s pomočjo encima superoksid dismutaza (SOD) najprej pretvori v vodikov peroksid in kisik, tako se ob povišani tvorbi $O_2^{\cdot-}$ v celici poviša tudi koncentracija H_2O_2 , pri čemer je en superoksid oksidiran do kisika drugi pa do H_2O_2 (povzeto po Neill in sod., 2002a; Mittler, 2002).

Čeprav velja H_2O_2 za ROS, ni radikal, kljub temu pa že v relativno nizkih koncentracijah ($10 \mu M$) povzroči poškodbe celice (cit. in Veljovic-Jovanovic in sod., 2002). Večino H_2O_2 v celici nastane z dismutacijo $O_2^{\cdot-}$ s SOD, v listih pa so eni izmed glavnih virov njegovega nastanka peroksisomi, kjer nastane direktno z glikolatno oksidazo (povzeto po Foyer in sod., 1997). H_2O_2 lahko deluje neposredno in posredno. Neposredno delovanje temelji na oksidativnih sposobnostih. H_2O_2 je tako sposoben degradirati hem proteine, inaktivirati encime, oksidirati DNA, lipide, -SH skupine in keto kisline. Posredno lahko iz H_2O_2 nastane OH^{\cdot} in $HClO$ (povzeto po Bienert in sod., 2006). H_2O_2 je relativno stabilna, v vodi dobro topna snov, ki lahko prehaja skozi lipidni dvosloj in tako prehaja z mesta nastanka drugam (povzeto po Neill in sod., 2002a).

2.4 OBRAMBNI MEHANIZMI PROTI OKSIDATIVNEMU STRESU

Organizmi morajo uravnati tako količino oksidantov kot antioksidantov. V primeru povečanja pro-oksidantov v primerjavi z antioksidanti govorimo o oksidativnem stresu.

Obratno pa ob povečanju koncentracije antioksidantov govorimo o reduktivnem stresu (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

Organizmi izpostavljeni oksidativnem stresu so razvili številne obrambne mehanizme. Rastlinska antioksidativna obramba poteka na 2 načina: z antioksidativnimi encimi in nizkomolekularnimi antioksidanti (Low-molecular-weight-antoksidants - LMWA) (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

2.4.1 Antioksidativni encimi

V skupino sodijo encimi, kot so superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) in peroksidaze (PX) (povzeto po Mittler, 2002).

Ločimo tri glavne tipe SOD, ki se v glavnem razlikujejo v prostetičnih skupinah. V rastlinah najdemo Cu/Zn SOD v citosolu, Mn SOD v mitohondriju in Cu/Zn in/ali Fe SOD v kloroplastu. SOD imajo pomembno vlogo pri redukciji O_2^- . Končni produkt reakcije je H_2O_2 , ki ga odstranjuje katalaza (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

Katalaza (CAT) odstranjuje H_2O_2 le pri visokih koncentracijah le-tega (povzeto po Mittler, 2002). Zaradi slabše učinkovitosti pri nižjih koncentracijah substrata jo najdemo v peroksisomih v izjemno visokih (celo kristaliničnih) koncentracijah (povzeto po Baker in Orlandi, 1999). Encim reagira z 2 molekulama H_2O_2 . Pri reakciji s prvo molekulom H_2O_2 nastane spojina I («compound I»), druga molekula H_2O_2 pa služi kot donor elektronov. Encim pri delovanju ne potrebuje energije (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

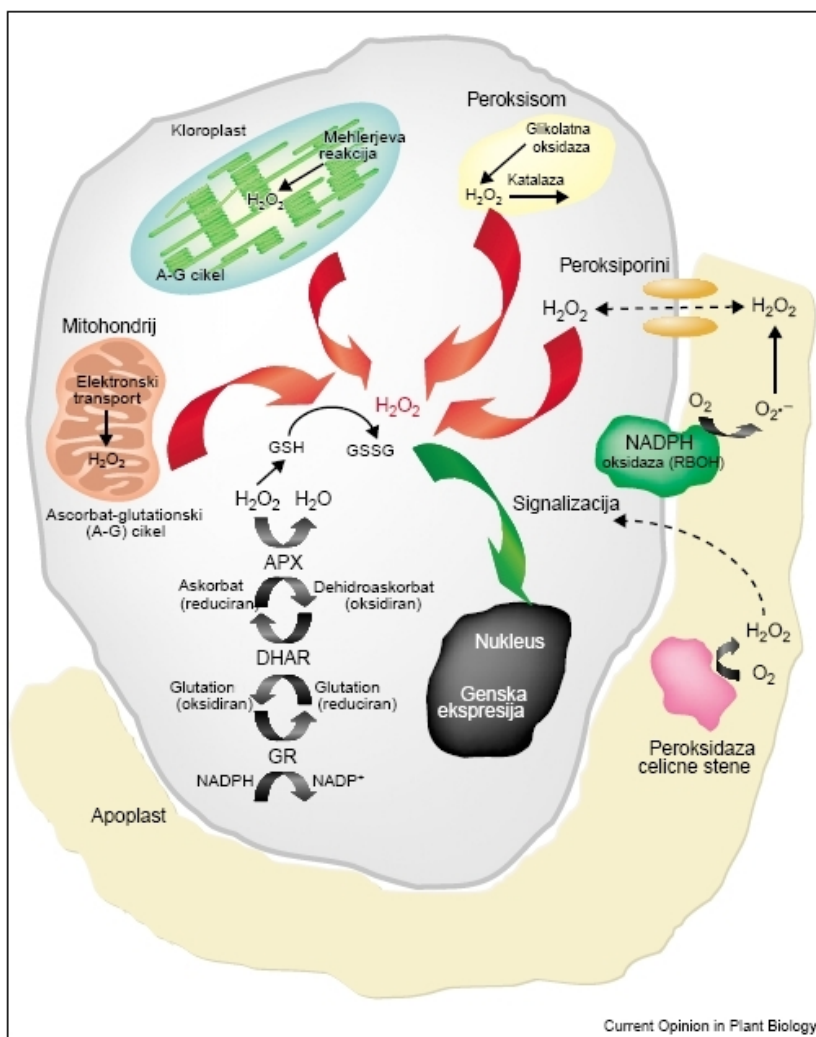
Peroksidaze (PX) imajo visoko afiniteto do H_2O_2 in ga odstranjujejo tudi pri nizkih koncentracijah (povzeto po Mittler, 2002). Donorja elektronov v reakciji sta npr. glutation in askorbat (Gara in sod., 2003). Odstranjevanje H_2O_2 je energetsko potratno, saj za odstanitev 1 molekule H_2O_2 potrebujemo 2 molekule glutationa (GSH) (povzeto po Baker in Orlandi, 1999; Kohen in Nyska, 2002).

2.4.2 Nizkomolekularni antioksidanti (LMWA)

LMWA lahko preko posrednega ali neposrednega stika onemogočijo poškodbe z ROS. Posredno s helacijo kovin preprečijo Haber-Waiss-ovo reakcijo, direktno pa z oddajanjem elektronov kisikovim radikalom. Prednost LMWA so v majhnosti molekul, ki lahko prehajajo celično membrano. Celica lahko uravnava njihovo koncentracijo in lahko se regenerirajo znotraj celice. Odstranjevalec radikalov («scavenger») je snov, ki reagira

direktno z radikali in tako z oddajanjem enega ali več elektronov reaktivni radikal spremeni v neaktivnega. S tem se tudi sam spremeni v radikal, vendar v nereaktivni radikal. Nadalje se lahko reducira z drugim odstranjevalcem radikalov. Sedaj drugi postane radikal, ki lahko sprejme elektrone od drugega donorja npr. NADPH (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).

Glutation (GSH) je tripeptid sestavljen iz glutaminske kisline, cisteina in glicina (povzeto po Kohen in Nyska, 2002). V oksidirani obliki se združita dve molekuli GSH z oksidacijo -SH skupine (povzeto po Foyer in sod., 1997). GSH najdemo pri ljudeh, živalih in aerobnih bakterijah v visokih (mikromolarnih) koncentracijah. GSH je posredni antioksidant v primeru peroksidaz, saj donira elektrone, ki so potrebni za razgradnjo H_2O_2 . Deluje lahko kot helat in s tem onemogoči Haber-Weiss-ovo reakcijo. GSH lahko interagira z OH^\cdot , ROO^\cdot in RO^\cdot radikali (povzeto po Kohen in Nyska, 2002).



Slika 1: Izvor in razgradnja H_2O_2 v rastlinski celici (Neill in sod., 2002a). APX- askorbat peroksidaza, DHAR- dehidroaskorbat reduktaza, GR- glutation reduktaza.

Askorbat (ASC), vodotopen antioksidant, je učinkovit odstranjevalec radikalov, saj kot donor elektronov ROS vrši eliminacijo le-teh. ASC lahko donira 2 elektrona. Z donacijo enega elektrona se tvori askorbilni (semidehidroaskorbat) radikal, ki se lahko oksidira v dehidroaskorbat. Zaradi stabilnosti semidehidroaskorbatnega radikala je askorbat kot antioksidant izjemno učinkovit. Semidehidroaskorbat se lahko nadalje oksidira in odda 1 elektron ali pa se reducira in sprejme elektron od GSH ali preko NADPH-semidehidroaskorbat reduktaze preko NADPH. Dehidroaskorbinska kislina se lahko regenerira s pomočjo dveh molekul GSH in encima dehidroaskorbat reduktaze (Slika 1), lahko pa se zaradi nestabilnosti razgradi na diketo-L-gulonsko kislino in nato do oksalne kisline (povzeto po Foyer in sod., 1997; Pignocchi in Foyer, 2003; Mittler, 2002; Kohen in Nyska, 2002).

2.5 VODIKOV PEROKSID V RASTLINAH

2.5.1 Vloga H_2O_2 v rastlinah

Novejše biokemijske in genetske raziskave uvrščajo H_2O_2 med signalne molekule biotskega in abiotskega stresa. H_2O_2 v celici nastaja tekom normalnega metabolizma, njegova obstojnost pa je bistveno pogojena z antioksidativnim sistemom. Abiotski stres (visoka ali nizka temperatura, dehidracija, UV, ozon...) poviša koncentracijo H_2O_2 in sproži odzive, kot so aktivacija encimov, gensko ekspresijo in programirano celično smrt (PCD). Mobilnost H_2O_2 je lahko zaradi razgradnje s strani antioksidantov omejena na celične domene imenovane »hot-spoti«. V apoplastu nastale molekule H_2O_2 lahko preko »peroksinorinov« potujejo v notranjost celice, kjer sledi nadaljnja presnova.

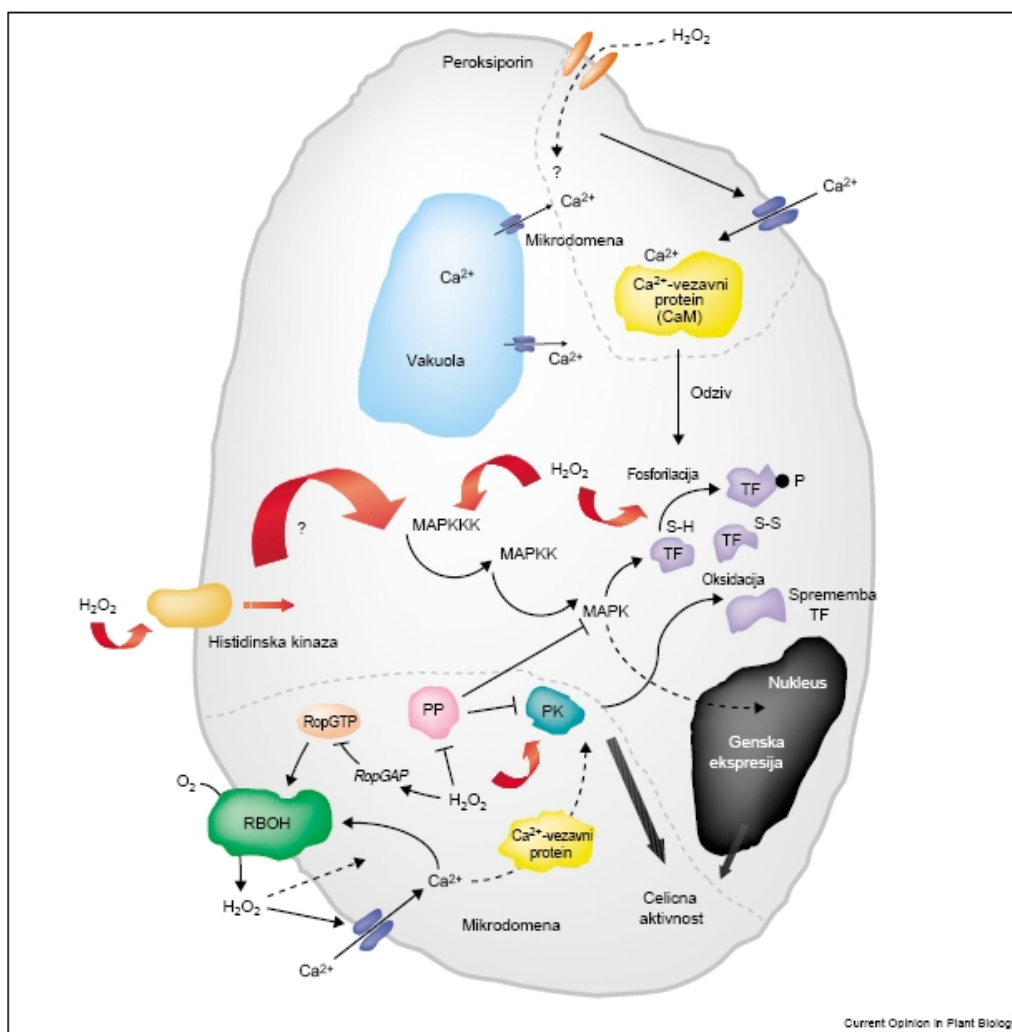
Večino H_2O_2 v celici tvori SOD. H_2O_2 se tvori tudi v kloroplastih, mitohondrijih in v peroksisomih s številnimi oksidazami npr. glikolatna oksidaza, urat oksidaza in acetil CoA oksidaza. Tvori se tudi kot produkt fotorespiracije in kot stranski produkt respiracije (povzeto po Foyer in sod., 1997).

H_2O_2 lahko skupaj z dušikovim oksidom (NO) povzroči PCD. Ni še povsem poznan mehanizem, vendar je najverjetneje nastop PCD povezan z nastankom por v zunanji membrani mitohondrijev. Novejše analize kažejo, da so pri celicah s celično steno vrste *Arabidopsis* za proženje PCD potrebne višje koncentracije H_2O_2 v primerjavi s koncentracijami, ki inicirajo PCD protoplastov. Razlog je najverjetneje v sposobnosti odstranjevanja H_2O_2 . Razpolovni čas 20 mM H_2O_2 , dodanega celicam s celično steno, znaša med 2-5 minut, v primeru protoplastov pa približno 1 h. Zmanjšana sposobnost

odstranjevanja H_2O_2 protoplastov gre na račun odstranitve s celično steno povezanih encimov npr. peroksidaz.

Posledica izpostavitve kulture *Arabidopsis* H_2O_2 je povišanje koncentracije H_2O_2 v mitohondrijih in nastop PCD. H_2O_2 lahko sproži aktivacijo mitogen-aktivacijske proteinske kinaze (MAPK), ki povzroči zvišanje koncentracije H_2O_2 v mitohondrijih in PCD, prav tako sodeluje pri zapiranju rež preko abscizinske kisline (ABA), ki lahko sproži ekspresijo gena za CAT, in nenazadnje H_2O_2 sodeluje tudi pri avksinsko reguliranem gravitropizmu (Slika 2).

H_2O_2 uravnava številne gene, vključno z geni antioksidativnega sistema in geni, ki so potrebni za proizvodnjo H_2O_2 . Analize z mikročipi kažejo, da se v kulturi predhodno tretirani z H_2O_2 izražajo geni, ki kodirajo antioksidativne encime, proteine potrebne za PCD, kalmodulin, proteinske kinaze, transkripcijske faktorje (TF) (povzeto po Neill in sod., 2002a; Neill in sod., 2002b).



Slika 2: Delovanje H_2O_2 kot signalne molekule (Neill in sod., 2002a).

H₂O₂ vpliva preko lipidne peroksidacije na senescenco listov riža. Raven malondialdehida (MDA) odraža lipidno peroksidacijo. Lin in Kao (1998) ugotavljata, da H₂O₂ povečuje razgradnjo proteinov, koncentracija MDA pa se v primerjavi s kontrolo poveča v listih tretiranih s H₂O₂, kar kaže na vpliv H₂O₂ na senescenco listov. Avtorja tudi ugotavljata, da dodatek H₂O₂ k odrezanim listom v petrijevki ne povzroči kopičenja endogenega H₂O₂ ampak celo upad, kar nakazuje na porabo H₂O₂ za lipidno peroksidacijo. Lipidna peroksidacija se poveča tudi v poganjkih in koreninah tretiranih s Cd in doseže najvišjo raven po 7 dneh (Ortega-Villasante in sod., 2005).

Abiotski stres, kakršen je npr. znižanje temperature, vpliva na produkcijo H₂O₂ pri pšenici (*Triticum aestivum*). Nižje temperature povzročijo prenos elektronov na kisik in nastanek H₂O₂. V listih pšenice, ki so v temi izpostavljeni temperaturi 4°C, je koncentracija H₂O₂ višja kot v listih pri 28°C na svetlobi in v temi. Najvišja koncentracija H₂O₂ je dosežena po nekaj minutni izpostavljenosti listov nižji temperaturi z vrhom med 3-5 minut (Okuda in sod., 1991). Tretiranje pšenice z nizkimi koncentracijami H₂O₂ in inhibitorjem katalaze izzove sintezo polipeptidov, ki so podobni polipeptidom, izoliranim iz rastlin izpostavljenih nizkim temperaturam. Raziskave kažejo, da je za dvig H₂O₂ najverjetneje odgovorna citosolna Cu/Zn SOD, saj ostaneta mitohondrijska in kloroplastna SOD nespremenjeni kot odziv na nizke temperature v temi (povzeto po Foyer in sod., 1997).

Navzkrižna toleranca («cross tolerance») kaže na možnost, da H₂O₂ deluje tudi kot signalna molekula. Znani so številni primeri, ko specifični abiotski stres preko oksidativnega stresa izzove toleranco rastline na drugo vrsto stresa, vključno z biološkim stresom (povzeto po Foyer in sod., 1997).

2.5.1.1 H₂O₂ kot odziv na biotski stres

Izpostavitve rastlinskih celic stresu povzroči aktivacijo membranske od NADPH odvisne superoksid sintaze in nastanka superoksida, ki ga apoplazmatska SOD pretvori v H₂O₂. Proizvodnja ROS med napadom patogena lahko povzroči uničenje patogenega organizma in omeji širjenje le-tega po rastlini, povzroči navzkrižno povezovanje proteinov celične stene ali odmrtnje celice. Pod stresnimi pogoji se povečajo nivoji nizkomolekularnih antioksidantov (LMWA) in tudi CAT, SOD, glutationske reduktaze (GR), askorbat peroksidaze (APX) in glutationske peroksidaze (GPX).

H₂O₂ se tvori po nekaj minutnem stiku elicitorja ali mikroba z rastlinsko celico. Največkrat inkompatibilna interakcija mikrob-rastlina izzove hipersenzitivno reakcijo (HR) in kot posledico PCD. H₂O₂ se pri inkompatibilnih interakcijah tvori v dveh stopnjah, v prvi

stopnji že po nekaj minutnem stiku s patogenom in v nadaljnji stopnji, ki je značilna le za inkompatibilne interakcije po 1- 3 urah po prvi stopnji. H_2O_2 naj bi imel v patogenezi dvojno vlogo. Kot prvo naj bi preprečil rast mikroba, kot drugo pa sprožil nastanek fitoalkesinov in s patogenezo povezanih proteinov (PR proteini) (povzeto po Foyer in sod., 1997).

H_2O_2 , ki nastane zaradi mikrobov, se nadalje transportira v celico, kjer skupaj s salicilno kislino (SA) in NO sproži odgovor rastline oz. PCD. NO in SA povzročita supresijo APX in CAT. Tako rastlina producira H_2O_2 in hkrati onemogoči njegovo odstranjevanje. Ključno vlogo pri PCD ima NO, brez katerega tudi ob povišanju ROS ne pride do PCD. Pri abiotskem stresu pa ROS inducira mehanizme za razgradnjo ROS npr. APX in CAT. Vprašanje, ki se postavlja je, kako rastlina regulira ROS v primeru napada mikroba in abiotskega stresa. Podatki za rastline tobaka kažejo, da so ob okužbi pokazale manjši delež PCD rastline, ki so bile predhodno izpostavljene abiotskemu stresu in so imele posledično povišane koncentracije antioksidantnih encimov. Rastline s povišano koncentracijo CAT so bile manj odporne na patogen (povzeto po Mittler, 2002).

Celotno interakcijo patogena z rastlino lahko razdelimo nekako na 3 stopnje, čeprav stopnje med seboj niso jasno ločene:

1. stopnja

V prvi stopnji pride do prepoznavne patogena in produkcije ROS. Transdukcija signala je vezana na kalcijeve (Ca^{2+}) tokove. Zgodnji odziv na patogen se v suspenziji celic pojavi že po 0,5-2 min in se zaključi po približno 15 min. Ko so tretirali suspenzije celic tobaka in soje s *Pseudomonas sp.*, koncentracija H_2O_2 ni presegla 15 μ M.

2. stopnja

Druga stopnja je posledica prepoznavne mikroba v prvi stopnji in se odraža v povišanju koncentracij antioksidantov, lipoksigenaze (LOX), tvorbi fitoaleksinov in lignifikaciji. Produkcija ROS med patogenezo lahko celo naraste, čeprav se tudi odstranjuje in je lahko posledično nižja kot v prvi stopnji.

3. stopnja

Zadnja stopnja patogeneze predstavlja razgradnjo in smrt celic (povzeto po Baker in Orlandi, 1999).

Primerjava ranitve (mehanske poškodbe) in napada herbivora kaže povišanje koncentracije H_2O_2 tako v okolici ranitve kot v območju herbivornega napada. Koncentracija H_2O_2 se poviša tudi v nepoškodovanih listih, kar govori v prid hipotezi, da so procesi sistemsko

regulirani. Primerjava omenjenih poškodb pokaže, da je koncentracija H_2O_2 signifikantno višja pri ranitvi, ki jo povzroči herbivor. Po preteku 1 h po napadu herbivora je v primerjavi z mehansko poškodovanim listom aktivnost encimov APX, PX, GR, GPX nižja, aktivnost SOD pa ostane nespremenjena. V primerjavi z mehansko poškodovanim listom pa se poveša aktivnost katalaze (CAT). Po 6 h se aktivnost encimov temeljito spremeni. Tako se npr. poveša aktivnost SOD, APX, PX, GR, napram listu z mehansko ranitvijo, aktivnost CAT pa ostane kot pri eni uri povišana napram listu s samo ranitvijo. Aktivnost GPX je 6 h po napadu herbivora nižja v primerjavi z aktivnostjo GPX v ranjenem listu, vendar višja od aktivnosti GPX v s herbivorom napadenem listu po 1 h (Maffei in sod., 2006).

V literaturi lahko zasledimo največ podatkov o odgovoru rastline na glivične in bakterijske okužbe, manj pa o odgovoru na okužbe z virusi (povzeto po Gara in sod., 2003).

Radwan in sod. (2006) so ugotovili, da se v na novo razvitih listih buč, ki so bile 14 dni pred poskusom mehansko inokulirane z virusom rumenega mozaika buč (ZYMV), aktivnost encimov SOD, CAT, PX in APX poveša. V primerjavi s kontrolo se aktivnost PX poveša 3-krat, aktivnost APX in CAT 2-krat in SOD 1,3-krat. Za okoli 54% se poveša tudi koncentracija H_2O_2 , ki pri kontroli znaša okoli 14 nmol/g sveže mase. Za približno 30% se poveša tudi koncentracija malondialdehida, kar kaže na povišano lipidno peroksidacijo.

Li in Burritt (2003) sta ugotovila, da se koncentracija H_2O_2 po okužbi z »Cocksfoot mottle virus« (CfMV) v občutljivih rastlinah pasje trave (*Dactylis glomerata* L.) zmanjša za več kot polovico v prvih treh dneh po inokulaciji. Koncentracija H_2O_2 nato počasi narašča in 20 dni po inokulaciji znaša 3 $\mu\text{mol/g}$ sveže mase, kar je 150 % ob inokulaciji izmerjene vrednosti.

Riedle-Bauer (2000) je odkril, da imajo pri kompatibilni interakciji patogen-rastlina pomembno vlogo peroksidaze. Pri rastlinah vrste *Cucumis sativus*, pred 20 dnevi inokuliranih s CMV (mozaični virus cvetače), je pri drugem pravem na novo razvitem listu odkril povišanje koncentracije SOD in kar za 7-kratno povišanje guajakol peroksidaze. Z elektroforeznimi testi je potrdil prisotnost peroksidaznih izoencimov, ki imajo sposobnost tvorbe H_2O_2 . Avtor je sklepa, da je dvig celokupne PX aktivnosti po okužbi z virusom, povezan z dvigom koncentracije H_2O_2 .

2.5.2 Peroksidaze (PX)

Obstaja več pokazateljev, da so peroksidaze vpletene tako v sintezo kot razgradnjo H_2O_2 . Raziskave kažejo, da se aktivnost peroksidaz po napadu herbivora poveča (Maffei in sod., 2006), prav tako so verjetno ravno peroksidaze odgovorne za krajši razpolovni čas dodanega H_2O_2 k celicam s celično steno napram protoplastom (povzeto po Neill in sod., 2002a).

Milavec (2004) za občutljivo sorto 'Igor' ugotavlja, da so največje razlike v aktivnosti pri topnih peroksidazah med okuženimi ter slepo inokuliranimi rastlinami in da je 3 h po okužbi aktivnost topnih peroksidaz 3-krat nižja od aktivnosti pri intaktnih rastlinah. Za ionsko vezane peroksidaze pravi, da je aktivnost 3 h po inokulaciji pri okuženih rastlinah nižja kot pri slepo inokuliranih in intaktnih, 6 h po inokulaciji pa je aktivnost teh encimov pri okuženih nekoliko nižja kot pri slepo inokuliranih in višja kot pri intaktnih rastlinah. V primeru kovalentno vezanih peroksidaz je 3 h po okužbi njihova aktivnost v okuženih rastlinah bistveno višja kot v slepo inokuliranih in intaktnih rastlinah, ter da po 6 h ni razlik med slepo inokuliranimi in okuženimi rastlinami.

Semprimožnik (1999) ugotavlja, da je aktivnost peroksidaz 24 h po inokulaciji v inokuliranih listih okuženih rastlin bistveno višja kot pri slepo inokuliranih in intaktnih rastlinah. V času pojava primarnih bolezenskih znamenj je bila v listih z bolezenskimi znamenji prav tako povečana aktivnost topnih in ionsko vezanih peroksidaz.

2.6 LUMINISCENČNE METODE DETEKCIJE VODIKOVEGA PEROKSIDA

Prisotnost H_2O_2 lahko potrdimo npr. z upadom začetne fluorescence skopoletina (7-hidroksi-6-metoksi-kumarin) običajno pa prisotnost potrdimo s fluorescenco predhodno nefluorescirajočih spojin npr. diacetildiklorofluorescin, p-hidroksifenilacetat, homovanilne kisline (3-metoksi-4-hidroksifenilacetna kislina) ali Amplex Red (N acetil-3,7 dihidroksifenoksazin). Po enakem principu deluje tudi oksidacija tetrametilbenzidina (povzeto po Tarpey in Fridovich, 2001 in Tarpey in sod., 2004).

Efekt dušenja fluorescence v bioloških vzorcih lahko v primeru skopoletina vodi do precenitve koncentracij H_2O_2 ali podcenitve v primerih uporabe ostalih (povzeto po Tarpey in Fridovich, 2001 in Tarpey in sod., 2004).

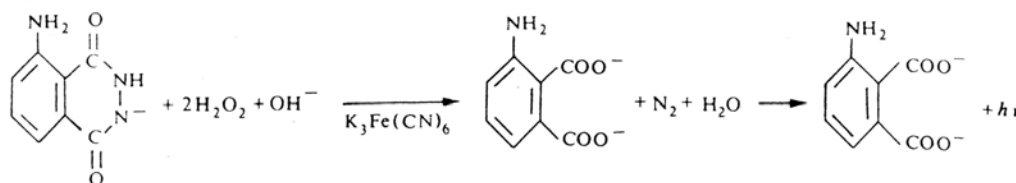
2.6.1 Luminiscenčne metode

Pestrost luminiscenčnih metod je izjemna. Poleg določanja koncentracij H_2O_2 pri rastlinah se metode uporabljajo tudi za dokazovanje krvnih madežev (Dilbeck, 2006), superoksidnega iona (povzeto po Tarpey in Fridovich, 2001; Tarpey in sod., 2004), dokazovanje številnih antioksidativnih lastnosti snovi (Krasowska in sod., 2000), v analizi hrane (povzeto po Naves in Jiménez, 1995), določanje prisotnosti kovin v vodi (Moliner-Martinez in sod., 2003), itd.

Kemiluminiscenca je pojav oddajanja vidne ali ultravijolične svetlobe, pri čemer se snov, ki svetlobo oddaja, ne segreje. Posebna vrsta kemiluminiscence je bioluminiscenca, ki poteka v živih organizmih npr. nekaterih žuželkah (kresnice), enoceličarjih, globokomorskih ribah in drugih (Kač, 2004).

Kemiluminiscenčne metode imajo več prednosti med katerimi je najpomembnejša občutljivost (povzeto po Naves in Jiménez, 1995), zaradi katere je metoda izjemno pomembna tudi v forenzičnih preiskavah, saj omogoča ugotavljanje krvnih madežev tudi pri razredčitvi 1:10.000 (Grofelnik, 2005). Pri takšni redčitvi se koncentracija DNA, ki je v krvi prisotna v majhnih količinah, tako zelo razredči, da je tudi z metodo pomnožitve DNA ne dokažemo več. Pri enaki redčitvi pa je z uporabo luminiscenčne metode moč dokazati železo in posledično prisotnost krvi.

Kemiluminiscenco barvila luminol (5-amino-2,3-dihidrofitalazin-1,4-dion) je prvič opisal Albrecht. Oksidacija luminola v bazičnih raztopinah povzroči nastanek energijsko bogatega intermediata, ki pri pretvorbi v aminofitalsko kislino odda energijo v obliki svetlobe (Slika 3) (povzeto po Naves in Jiménez, 1995).



Slika 3: Prikaz reakcije luminola v prisotnosti H_2O_2 in katalizatorja (Warm in Laties, 1982).

2.6.2 Uporaba polivinilpirolidona (PVP) za odstranitev fenolnih spojin

Fenolne spojine že same po sebi dušijo luminiscenco, torej z delno odstranitvijo ali neodstranitvijo dobimo manjši signal kot v primeru popolne odstranitve. Polivinilpirolidon (PVP) veže fenolne spojine in jih odstrani iz supernatanta. Testiranje dodane količine PVP (izraženega kot % mase na volumen (w/v)) kažejo, da pri 5% dodatku PVP luminiscenca doseže plato in se bistveno ne spreminja s povečevanjem količine PVP (Pérez in Rubio, 2006). Uporaba PVP je nujna v primeru nadaljnje uporabe askorbat oksidaze za odstranitev askorbata (Veljovic-Jovanovic in sod., 2002).

2.6.3 Vpliv dušenja luminiscence

Že Warm in Laties (1982) sta opazila, da »obarvani produkti« dušijo luminiscenco. Novejše raziskave pa kažejo, da dušenje luminiscence poteka na dveh nivojih, in sicer s kemikalijami, ki absorbirajo v spektru luminiscence barvila (npr. luminola), ter z interakcijo med ekstraktom in kemikalijami reakcijske mešanice, ki so potrebne za zaznavo H_2O_2 . Tako je možna redukcija fericianida v ferocianid in znižanje luminiscence (Veljovic-Jovanovic in sod., 2002). Glutation je sposoben dušitve elektrokemiluminiscentne metode že v pikomolarnih koncentracijah (Yifeng in sod., 2003).

Razinger in sod. (2006) uporabijo luminiscenčno metodo in čitalec mikrotiterskih ploščic za ugotavljanje celokupnega antioksidativnega potenciala vodne leče.

2.6.4 Vpliv pH vrednosti na luminiscenco

pH vpliva na jakost luminiscence, ki je višja pri visokih pH vrednostih, pod pH 7 pa preneha. pH vpliva tudi na dušenje antioksidantov. BHT (butiliran hidroksitoluen), komercialno uporabljan antioksidant, duši v enaki koncentraciji pri pH 8 41,7% luminiscence, pri pH 12 pa kar 86,3% (Krasowska in sod., 2000).

2.7 OSTALE METODE DETEKCIJE VODIKOVEGA PEROKSIDA

Za natančno določitev in subcelularno analizo H_2O_2 je najbolje uporabiti več različnih metod (Maffei in sod., 2006).

2.7.1 Metoda z 2',7' diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA)

Metoda temelji na dejstvu, da 2',7' diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA) lahko potuje v celice, kjer esteraze odcepijo diacetat (DA) in tako povzročijo, da nefluorescentni 2',7' diklorofluorescein (DCFH) ostane ujet v celici. Nadaljnja oksidacija DCFH v 2',7' diklorofluorescein (DCF) s H_2O_2 poteče ob prisotnosti hematina, peroksidaz ali citokroma *c*. Fluorescenca DCF se meri z ekscitacijo pri 498 nm in emisijo pri 522 nm (povzeto po Tarpey in Fridovich, 2001 in Tarpey in sod., 2004).

Lu in Higgings (1998) metodo uporabita na način, da v liste infiltrirata DCFH-DA, nato pa liste pregledata pod UV lučjo ali pa liste mesta infiltracije izrežeta in fluorimetrično določita koncentracijo H_2O_2 . Spremembo fluorescence DCFH lahko opazujemo tudi s pomočjo epifluorescence (Ortega-Villasante in sod., 2005).

Novejše raziskave postavljajo pod vprašaj porazdelitev DCFH-DA, DCFH in DCF v celici, saj naj bi ostal DCFH v membrani (Afri in sod., 2004).

Razinger in sod. (2007) predstavijo metodo zaznavanja ROS v realnem času z uporabo DCFH-DA in posebne EMCCD kamere. Metoda omogoča določitev ROS v simplastu ali apoplastu.

Metoda je uporabna predvsem v živalskih sistemih (Walrand in sod., 2003).

2.7.2 Amplex Red

Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay kit omogoča določitev H_2O_2 . Postopek priprave ekstrakta je podoben kot pri drugih metodah. Po ekstrakciji, centrifugiranju, nevtralizaciji ter čiščenju ekstrakta poteče reakcija med H_2O_2 v reakcijski mešanici s hrenovo peroksidazo in Amplex Red. Sledi merjenje fluorescence pri ekscitaciji 560 ± 5 nm in emisiji 590 ± 5 nm s čitalcem mikrotiterskih ploščic (Orozo-Cárdenas in Ryan, 2002).

2.7.3 Histokemijska detekcija H_2O_2 z odtisom rastlinskega materiala »tissue printing«

Histokemijska metoda odtisa posebej pripravljenega rastlinskega materiala (»tissue printing«) na nitrocelulozno, agarozno, škrobno ali najlonsko podlago omogoča prenos

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

proteinov, encimov, kemikalij v sveže odrezanem tkivu na omenjene medije. Ugotavljanje prisotnosti H_2O_2 temelji na oksidaciji kalijevega jodida (KI) do elementarnega joda I_2 vidna kot formacija modro-črnih I_2 -škrobovih kompleksov (Neves in sod., 1998).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

3.1.1 Priprava poskusnih rastlin

Rastline krompirja 'Igor' smo razmnožili z nodijsko kulturo iz zdravih rastlin, ki smo jih predhodno testirali na virusne povzročitelje bolezni. Rastline krompirja smo razrezali na nodije, pri čemer smo od posamezne rastline odvzeli po največ 5 nodijev. Uporabili smo sredinske nodije, spodnje in zgornje nodije vsake rastline pa smo zavrgli. Tako razrezane nodije smo nato v pravilni orientaciji posadili v sterilno gojišče za zakoreninjenje v petrijevkah. Po 14 dneh rasti v komori z dnevno temperaturo 20°C, nočno 19°C in 16-urnim osvetljevanjem smo rastline prestavili v zemljo in v komoro z dnevno temperaturo 22°C, nočno temperaturo 20°C, 75% vlažnostjo in 16-urnim osvetljevanjem. Rastline so tako rasle 4 tedne, nato pa smo izvedli poskus.

3.1.2 Inokulacija rastlin

Za poskus smo rastline razdelili v tri skupine; intaktne (K), slepo inokulirane (S) in okužene rastline (Y). Skupino okuženih rastlin predstavljajo rastline, ki smo jih inokulirali s sveže pripravljenim ekstraktom rastlin okuženih z virusom PVY, slepo inokulirane (S) smo inokulirali z ekstraktom zdravih rastlin. Kontrolnih rastlin (K) nismo inokulirali.

Rastline so bile pred poskusom osvetljene 1 h, medsebojno pomešane in inokulirane po spodaj opisanem postopku.

3.1.2.1 Postopek inokulacije

Najprej smo rastline postavili na pladnje in razdelili glede na nadaljnji tretma na okužene (Y), slepo inokulirane (S) in intaktne kontrolne rastline (K). Vsako skupino smo nadalje razdelili še na 5 podskupin, pri čemer je vsaka podskupina predstavljala eno časovno točko po inokulaciji (30 minut, 1 h, 3 h, 6 h, simptomi). Liste podskupine simptomi (Slika 4) smo pobrali 7 dni po inokulaciji. Vsaka podskupina je vsebovala po pet rastlin, razen pri K v

podskupini 6 h, kjer so bile le štiri rastline, in v podskupini simptomi, kjer sta bili le dve rastlini. V skupini S pri podskupini simptomi so bile tudi le tri rastline.

Postopek inokulacije je bil podoben pri slepo inokulirani in okuženi skupini, razlikoval se je le v inokulumu. Za inokulum smo uporabili rastline krompirja sorte 'Pentland' gojene v tkivni kulturi in sicer zdrave rastline za inokulum slepo inokuliranih rastlin in okužene z virusom Y^{NTN} za inokulum okuženih rastlin. Svež rastlinski material (brez korenin) smo strli v terilnici z dodatkom fosfatnega pufru (2,6 mM NaH₂PO₄, 15,2 mM Na₂HPO₄, 0,1% DETC (natrijev dietilditiokarbamat) pH 7,6) v razmerju 1 : 3 (rastlinski material : pufer). Nato smo si naredili zaščitne rokavice in na vsaki rastlini označili 2-3 spodnje liste. Označene liste smo narahlo potresli s karborundom in nato podrgnili s prstom namočenim v ustrezen inokulum. Po preteku 10 minut od mehanske inokulacije zadnje rastline smo inokulirane liste sprali z navadno vodo in rastline prenesli v komoro. V komoro nismo prenesli le rastlin v podskupini 30 minut.

3.1.3 Pobiranje in shranjevanje rastlinskega materiala

Pred pričetkom pobiranja listov smo pripravili sveže terilnice in jih ohladili s tekočim dušikom. V načrtovanih časovnih točkah smo pobrali spodnje inokulirane liste okuženih in slepo inokuliranih rastlin, ter odgovarjajoče liste intaktnih rastlin.



Slika 4: Prikaz rastline občutljivega kultivarja 'Igor' 7 dni po okužbi z virusom PVY^{NTN} (levo), ter povečava spodnjega inokuliranega lista (desno).

V dušiku zmrznjene liste smo nato s pestilom strli v prah, jih prenesli v epruvete Falcon in shranili v zamrzovalniku pri -80°C.

3.2 EKSTRAKCIJA, ČIŠČENJE IN MERJENJE VODIKOVEGA PEROKSIDA RASTLINSKEGA MATERIALA

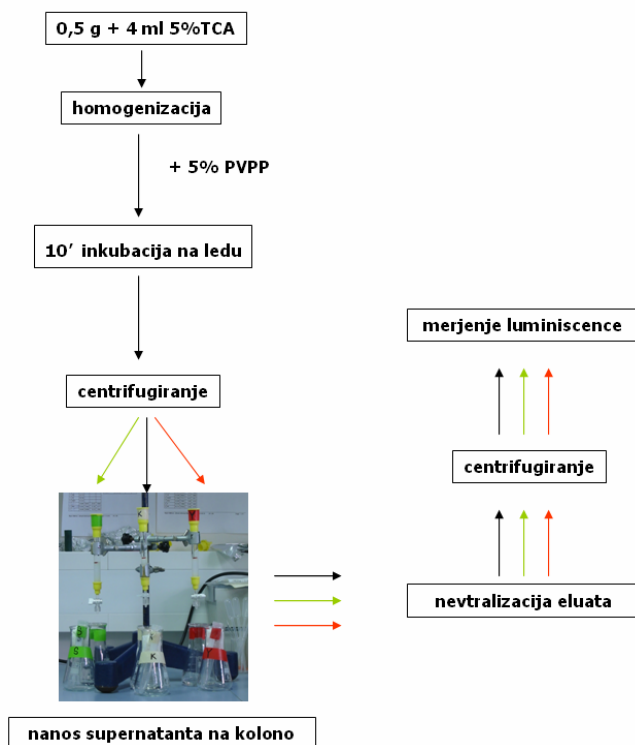
Predstavljen je najprimernejši postopek po katerem smo ekstrahirali H₂O₂ in čistili rastlinski material in se nanaša na zadnji del diplomske naloge – analizo rastlinskega materiala. Tekom, naših raziskav smo prilagajali številne dejavnike in so v primeru, da so pomembni, navedeni v rezultatih.

Metodo merjenja luminiscence smo prilagodili po Warm in Laties (1982) in Veljovic-Jovanovic s sod. (2002).

Za uporabo luminiscenčne metode smo se odločili zaradi pogoste uporabe omenjene metode za analizo vodikovega peroksida pri rastlinah, cenovno ugodnih reaktantov in razpoložljive aparature.

3.2.1 Ekstrakcija

V vsako od treh v tekočem dušiku predhodno ohlajenih epruvet Falcon smo zatehtali po $0,5 \pm 0,05$ g zmrznjenega rastlinskega materiala. Primeri, v katerih rastlinskega materiala ni bilo dovolj, so označeni. Pazili smo, da se rastlinski material ni odtalil. K 0,5 g zatehtanega zmrznjenega rastlinskega materiala smo dodali 4 ml ledeno hladne 5 % triklorocetne kisline (TCA). Homogenizirali smo 3 minute z Ultra Turrax T 25 Basic pri 24.000 obratih na ledu. Po treh minutah smo dodali 225 mg PVPP (polivinilpolipirrolidon) (Sigma), premešali in inkubirali 10 minut na ledu. Nato smo centrifugirali 30 minut pri 12.000 g in 4°C (Backman Avanti J-25). Postopek ekstrakcije je prikazan na sliki 5.



Slika 5 : Poenostavljen prikaz obdelave rastlinskega materiala.

3.2.2 Čiščenje rastlinskega materiala

Prvi del čiščenja, odstranitev fenolnih substanc s PVPP, je potekalo že med centrifugiranjem. Nadaljnje čiščenje pa je potekalo z ionsko izmenjevalno kromatografijo. V oklepajih so navedeni podatki za primere, ko smo uporabili askorbat oksidazo kot inaktivatorja askorbata, dušilca luminiscence. 1 (2) ml supernatanta smo nanесли na kolono (1,4 x 8 cm) s cca. 0,5 (1) g DEAE Sephadex A-25 (Sigma). Predhodno je bila kolona ekvilibrirana z 8 (15) ml 5 % TCA. Po nanosu smo kolono eluirali z 3,5 (7) ml 5 % TCA ter eluat lovili v epruveti Falcon.

Nadaljnji postopek se je razlikoval glede na to ali smo za čiščenje uporabili encim askorbat oksidazo ali ne.

3.2.2.1 Uporaba encima askorbat oksidaze za inaktivacijo askorbata

pH eluata smo uravnali s 5 M, 1 M in 0,5 M K_2CO_3 približno na vrednost 6. pH smo merili z lakmusovimi listi ali pH metrom (Mettler Toledo, MP 225). K 500 μ l eluata smo dodali 10 μ l (1 enota) askorbat oksidaze (Sigma) za inaktivacijo askorbata in inkubirali pri sobni

temperaturi 10 minut. Nadaljnji postopek je enak kot v primeru, ko askorbat oksidaze nismo uporabili.

3.2.2.2 Postopek brez uporabe encima askorbat oksidaze

V primeru, ko encima askorbat oksidaze nismo uporabili smo celoten volumen eluata nevtralizirali s K_2CO_3 do pH 6,4 - 6,51. Nato smo odvzeli 1 ml raztopine, jo centrifugirali (Micro-242, Tehtnica Železniki) 5 minut pri sobni temperaturi, ter nato izmerili luminiscenco.

3.2.3 Merjenje luminiscence

Luminiscenca upada v času izjemno hitro, zato je pomembno, da opravimo meritev čim hitreje po pričetku reakcije in vedno v enakih časovnih intervalih. Zaradi številnih dejavnikov, ki vplivajo na luminiscenco, je nujno vzdrževati konstantne pogoje meritev.

Kemikalije za merjenje luminiscence smo do roba nalili v banjice. Nato smo na drugo ploščico, kjer ni potekala meritev, z enokanalno pipeto v luknjice nanесли po 250 μ l vzorca, in sicer v prvo luknjico ekstrakt okuženih rastlin, v drugo ekstrakt slepo inokuliranih rastlin, v tretjo ekstrakt intaktnih rastlin in v zadnjo ddH₂O ali standard. V luknjice ploščice namenjene meritvi smo z večkanalno pipeto odpipetirali najprej 175 μ l 0,2 M amonijevega hidroksida (NH₄OH) (Merck), nato še 25 μ l 1 mM luminola (Merck), ter 25 μ l vzorca. Po odpipetiranju kemikalij smo vklopili snemalnik zvoka in z večkanalno pipeto prenesli 10 μ l 0,5 mM fericianida (K₃Fe(CN)₆) (Sigma). V času 25 s smo prenesli ploščico, nanjo postavili črno ploščico in jo postavili na prostor za vpoteg. Po pretečenih 25 s, smo na računalniku pritisnili gumb »START« in pričela se je meritev. Za merjenje luminiscence smo uporabili čitalec mikrotiterskih ploščic Tecan GENios s pripadajočo programsko opremo. Predhodno smo aparaturo nastavili na 28°C.

V primerih, ko smo namesto vzorca odpipetirali standard – različno redčen H₂O₂ (Merck), smo le-tega pripravili dnevno svežega. Za slepi vzorec (SV) smo odpipetirali ddH₂O. Ostale kemikalije potrebne za merjenje luminiscence smo pripravljali tedensko sveže, in sicer najprej NH₄OH, kateremu smo pH uravnali na 9,5 s HCl, nato pa pripravili luminol in K₃Fe(CN)₆ v NH₄OH.

3.2.3.1 Uporaba založne raztopine amonijevega hidroksida in luminola

Da bi delo še bolj poenostavili, smo poskusili tudi s pripravo sorazmerne raztopine amonijevega hidroksida in luminola. Namesto, da bi z večkanalno pipeto odpipetirali 175 μl NH_4OH in 25 μl luminola, smo odpipetirali po 200 μl pripravljene raztopine. Vendar se za nadaljnjo uporabo raztopine zaradi težav, predstavljenih pod Rezultati, nismo odločili.

3.2.3.2 Ugotavljanje dejavnikov, ki vplivajo na rezultat meritve

Največ raziskovalnega dela je bilo vložena v odkrivanje dejavnikov, ki vplivajo na rezultat meritve. Najprej smo izločili možnosti večjih napak zaradi našega dela, nato pa poskušali izvesti meritve standarda pod čimbolj konstantnimi pogoji ter spreminjanjem le posameznih dejavnikov. Tako dobljene podatke smo nato primerjali glede na meritev časovno (dopoldne/popodne), glede na starost kemikalij oz. na spreminjajoči se dejavnik. Z ugotovitvijo vpliva nekega dejavnika, smo poskušali ugotoviti najbolj ugodno stanje tega za naše meritve in ugotovitev privzeli za vse nadalje meritve.

3.2.4 Izkoristek

Določanje izkoristka vodikovega peroksida smo izvedli na enak način kot v primeru vzorca, le da smo namesto vzorca uporabili znano koncentracijo vodikovega peroksida. Vodikov peroksid smo pripravili v vodi. Nadaljnje spiranje kolone in uravnavanje pH-ja je potekalo na enak način kot pri vzorcu. Na kolono smo nanegli 1 ml 100 μM H_2O_2 in eluirali z 3,5 ml 5 % TCA, tako da je končna preračunana koncentracija v eluatu znašala 28,6 μM H_2O_2 .

3.2.5 Čiščenje mikrotiterskih ploščic

Po opravljeni meritvi smo s pipeto pobrali merjeno reakcijsko mešanico iz posameznih luknjic. Po uporabi zadnje luknjice smo mikrotiterske plošče shranili in čistili po naslednjem postopku:

- prvo čiščenje s 70 % etanolom;
- nadaljnje čiščenje z vodo iz vodovodne napeljave;
- čiščenje in spiranje z ddH_2O ter
- sušenje ploščic in dodatek oznake dneva čiščenja na zadnjo stran ploščice.

Tako čiščene ploščice smo uporabili v fazi vpeljave metode, celoten rastlinski material pa je bil testiran na novih, predhodno neuporabljenih ploščicah.

3.3 AKTIVACIJA IN REGENERACIJA DEAE SEPHADEX A-25

3.3.1 Aktivacija DEAE Sephadex A-25

Gel smo namočili v ddH₂O, kateri smo pH uravnali s 5 % TCA na 2-3. Namoden gel smo pred uporabo postavili vsaj za 24 h v hladilnik na 4°C.

3.3.2 Regeneracija DEAE Sephadex A-25

Gel smo po uporabi sprali vsaj z dvojnimi volumni ddH₂O in shranili v steklenici pri 4°C. Pred regeneracijo smo izmerili volumen gela, nato gel prelili z dvojnimi volumni ddH₂O, počakali, da se je gel posedel, odlili ddH₂O in ga nato prelili z enojnim volumnom 5 N CH₃COOH v 80% metanolu (Lepan Narić, 1997). Po posedanju gela smo le tega ponovno premešali in prenučirali, sprali z enojnim volumnom ddH₂O in nato raztopili v raztopini vode in TCA, tako da je pH vrednost znašala med 1 in 3.

3.4 OBDELAVA REZULTATOV MERITEV LUMINISCENCE

Dobljene rezultate meritev smo obdelali na različne načine. Vsi načini obdelave rezultatov meritev so predstavljeni v poglavju Rezultati.

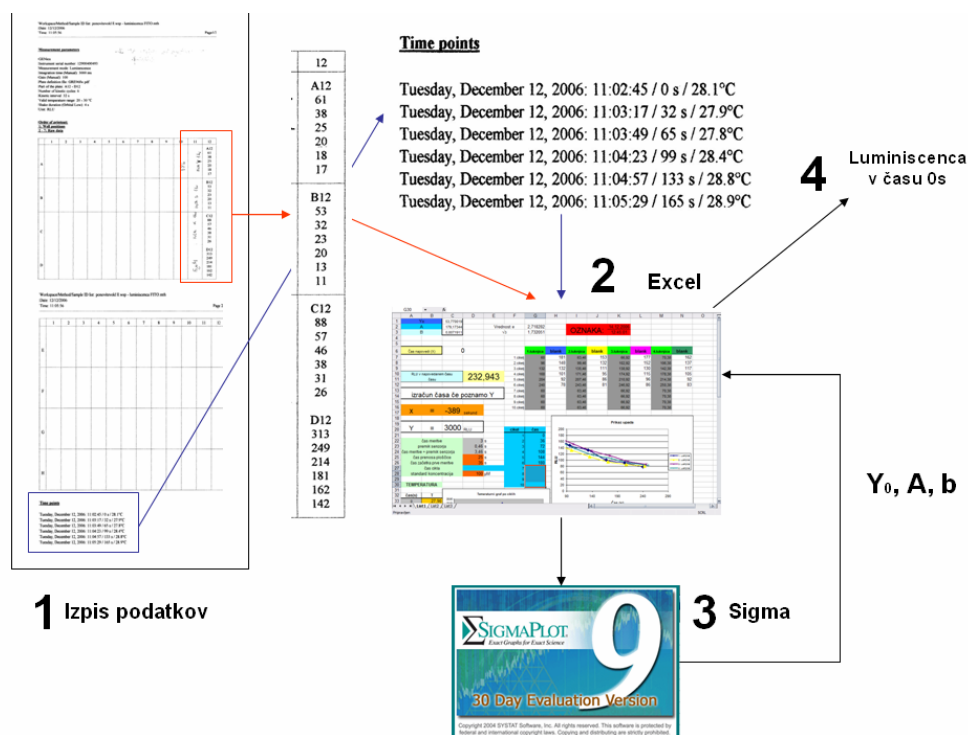
Obdelava podatkov temelji na dejstvih, da čitalec Tecan GENios meri vzorce na mikrotiterski ploščici zaporedno, da intervali med prvo in nadaljno meritvijo istega vzorca niso enaki, ter da luminiscenca upada v odvisnosti od vzorca. Vse te podatke smo uporabili pri obdelavi rezultatov meritve, način obdelave podatkov pa je natančneje prikazan v prilogi.

3.4.1 Izračun luminiscence v času 0 s

Upad luminiscence je odvisen od koncentracije vodikovega peroksida, prisotnosti dušilcev v vzorcu in samega časa pričetka meritve. Tecan GENios aparatura meri vzorce zaporedno, zato nastane časovna razlika med meritvami vzorcev. Zaradi različnega časovnega

intervala med pričetkom reakcije in meritvijo vzorcev prihaja do razlik v upadih luminiscenc vzorcev. Da bi izničili omenjeno slabost, smo rezultate meritev matematično preračunali na čas 0 s po spodaj opisanem postopku.

Rezultate meritev smo vnesli v Excel in k njim pripisali ustrezne časovne vrednosti dobljene iz izpisa Tecana GENios. Tako dobljene časovne točke z meritvami smo nato prenesli v program Sigma, kjer smo narisali krivuljo danih točk na $Y = Y_0 + Ae^{-bx}$ in tako pridobili vrednosti Y_0 , A , b . Y predstavlja luminiscenco v danem času, Y_0 asymptoto, A predstavlja konstanto, b faktor upada luminiscence in x čas. Te vrednosti smo nato prenesli v Excel in izračunali luminiscenco v času 0 s (Slika 6) ali v času meritve prvega vzorca.



Slika 6: Prikaz ekstrapolacije oz. izračuna luminiscence na čas 0 s v 4-ih korakih.

3.4.2 Izračun ploščin

V določenih primerih je smotrnejše uporabiti namesto samega rezultata meritve – vrednosti luminiscence, ploščino med krivuljo upada luminiscence in asymptoto.

Postopek obdelave podatkov za izračun ploščine je enak do četrtega koraka. Nato pa namesto, da bi podatke Y_0 , A , b vstavili v enačbo in za x izbrali 0 s podatke vnesemo v naslednjo enačbo z mejami od 0 do ∞ :

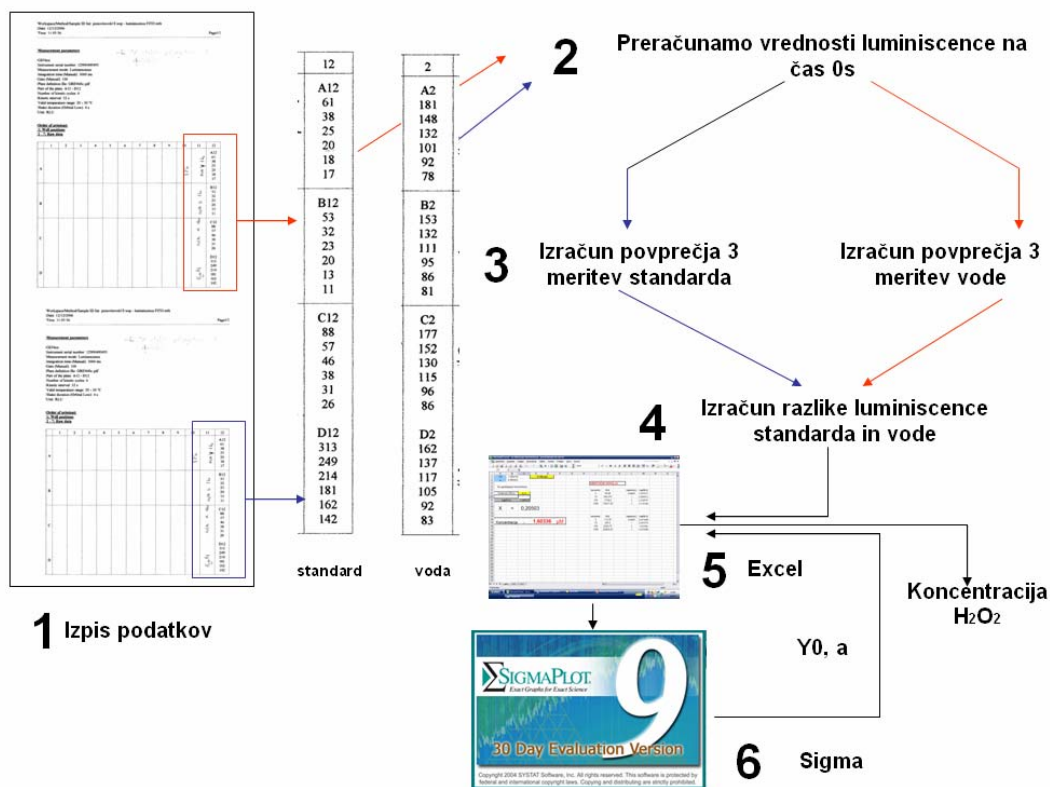
$$\int (Ae^{-bx}) dx = -\frac{A \times e^{-bx}}{b \times LN(e)} + \frac{A}{b \times LN(e)} \quad \dots (1)$$

Tako pridobimo ploščino, katero nato poljubno primerjamo s ploščino druge krivulje z upoštevanjem pomanjkljivosti.

3.4.3 Izračun umeritvene krivulje in določitev koncentracije H₂O₂ v vzorcu

Ker luminiscenca ne narašča linearno, ampak eksponentno, je potrebno eksponentno funkcijo logaritemsko transformirati, da pridobimo linearen odnos. To smo naredili v sledečih korakih (Slika 7) :

1. Od povprečne vrednosti luminiscence standarda izračunane na čas 0 s smo odšteli povprečno luminiscenco slepega vzorca. Povprečen slepi vzorec smo izračunali tako, da smo izračunali luminiscenco le-tega v času 0 s, nato pa izračunali povprečje.
2. Nato smo na ordinato grafa nanesti desetiški logaritem povprečne razlike vrednosti luminiscence standarda, na absciso pa desetiški logaritem koncentracije vodikovega peroksida.
3. Skozi točke smo izračunali najoptimalnejšo premico in določili k in n premice $y = kx + n$.
4. Od posamezne izmerjene in na čas 0 s preračunane vrednosti vzorca smo odšteli povprečen slepi vzorec in logaritemski vrednosti na premici poiskali x , kateremu je ustrezala logaritemska vrednost koncentracije vodikovega peroksida v rastlini, vrednost x smo nato antilogaritmirali in prišli do koncentracije vodikovega peroksida v rastlini.



Slika 7: Shematski prikaz načina izračuna koncentracije H₂O₂ v rastlinskem materialu.

3.4.4 Izračun količine vodikovega peroksida na gram rastlinskega materiala

Primer izračuna količine H₂O₂ v vzorcu:

$$C_{\text{(izmerjena količina H}_2\text{O}_2)} = C_{\text{(eluata)}} = 5,21 \mu\text{M}$$

$$V_{\text{(eluata)}} = 3,5 \text{ ml}$$

$$V_{\text{(nanešenega supernatanta)}} = 1 \text{ ml}$$

$$V_{\text{(5\% TCA za ekstrakcijo)}} = 4 \text{ ml}$$

$$m_{\text{(rastlinskega materiala)}} = 0,5 \text{ g}$$

$$M_{\text{(H}_2\text{O}_2)} = 34 \text{ g/mol}$$

$$n_{\text{(H}_2\text{O}_2)} / \text{g}_{\text{(materiala)}} = ?$$

$$c = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M}}{V} = \frac{m}{MV}$$

$$m_{(H_2O_2 \text{ eluata})} = C_{(eluata)} \times M_{(H_2O_2)} \times V_{(eluata)} = 5,21 \times 10^{-6} \text{ M} \times 34 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 3,5 \times 10^{-3} \text{ l} = 620 \times 10^{-9} \text{ g}$$

Ker pa smo na kolono nanesti 1 ml supernatanta od 4 ml, je potrebno rezultat pomnožiti s 4, da dobimo maso H_2O_2 v 0,5 g rastlinskega materiala.

$$m_{(H_2O_2 \text{ v eluatu})} = m_{(H_2O_2 \text{ nanešenega na kolono})} = \frac{1}{4} m_{(\text{celokupnega } H_2O_2 \text{ v } 0,5 \text{ g materiala})}$$

$$m_{(\text{celokupnega } H_2O_2 \text{ v } 0,5 \text{ g materiala})} = 2480 \times 10^{-9} \text{ g}$$

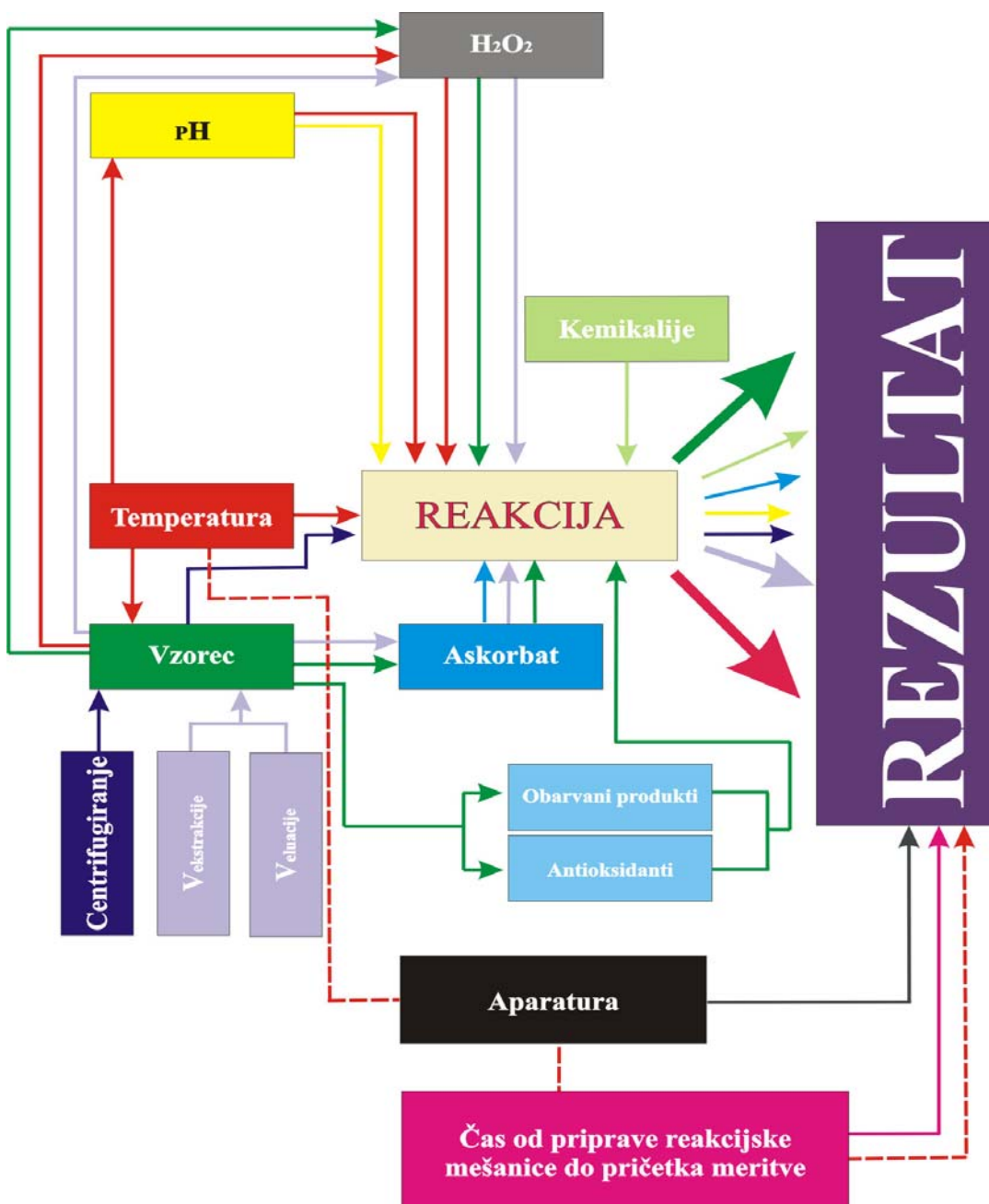
$$m_{(H_2O_2)} = 4969 \text{ ng} \approx 4,97 \mu\text{g/g materiala}$$

$$n_{(H_2O_2)} = 145,9 \text{ nmol/g materiala}$$

4 REZULTATI

4.1 VPLIV NAJPOMEMBNEJŠIH DEJAVNIKOV NA REZULTAT MERITVE

Ugotovili smo, da številni dejavniki vplivajo na končni rezultat meritve. Nekateri glavni dejavniki in odnosi med njimi so predstavljeni na sliki 8.



Slika 8: Pregled najpomembnejših vplivov različnih dejavnikov na rezultat meritve in odnosi med njimi.

Temperatura vpliva na končni rezultat meritve preko hitrosti reakcije, *pH* vrednosti in obstojnosti H_2O_2 . V našem primeru pa *temperatura* vpliva tudi na aparaturo za merjenje luminiscence in preko le-te na *čas pričetka meritve* ter s tem seveda na rezultat meritve. Na luminiscenco vplivajo tudi različne snovi prisotne v vzorcu npr. H_2O_2 , askorbat, antioksidanti in obarvani produkti. Na koncentracijo omenjenih spojin pa preko redčenja vplivata *volumen ekstrakta in eluata*. Povsem ločen vpliv ima *centrifugiranje*. Na sam rezultat luminiscence vzorca preko *kemikalij* najverjetneje vpliva tudi *voda*, v kateri so kemikalije pripravljene, saj se, kot smo pokazali, luminiscenca slepega vzorca spreminja. *Svetloba* vpliva na razpad H_2O_2 in na *kemikalije* ter tako na luminiscenco. *Aparatura* vpliva na rezultat preko *stresanja* in *časa pričetka meritve* prvega vzorca, ki je v našem primeru odvisen od *temperaturne* nastavitve aparature. *Čas pričetka meritve* prve luknjice je odvisen tudi od našega dela. *Kemikalijam pH* s časom upada, kar vpliva na rezultat meritve.

4.2 OPTIMIZACIJA POSTOPKA EKSTRAKCIJE

4.2.1 Centrifugiranje

Preizkusili smo dve opciji centrifugiranja: prva 10 min pri 12.000 g in druga 20 min pri 1.400 g. Temperatura centrifugiranja je bila v obeh primerih 4°C. Celoten postopek ekstrakcije in nadaljnje obdelave je bil identičen v obeh primerih. Ugotovili smo, da je luminiscenca v primeru krajšega časa centrifugiranja pri višjih obratih približno 46 % višja, zato smo vse nadaljnje centrifugiranje opravili pri višjih obratih in še podaljšali čas z 10 min na 30 min.

4.2.2 Volumen elucije

Na kolono napolnjeno z 1g DEAE in ekvilibrirano s 15 ml 5 % TCA smo nanesti 2 ml 1 mM H_2O_2 pripravljene v dd H_2O . Po nanosu smo kolono sprali z 10 ml 5 % TCA, eluat pa lovili v dve frakciji. Prva frakcija je predstavljala prvih 7 ml eluata, druga pa nadaljnjih 5 ml. Ugotovili smo, da se je večina H_2O_2 sprala že v prvih 7 ml, zato smo za izpiranje v nadaljnjih ekstrahiranjah uporabljali 7 ml 5 % TCA.

4.3 LUMINISCENCA

4.3.1 Luminiscenca kemikalij z in brez $K_3Fe(CN)_6$

V začetnih fazah raziskovanja smo pokazali tudi, da je fericianid odgovoren za nastanek luminiscence, H_2O_2 pa deluje kot ojačevalec le-te. Kadar k reakcijski mešanici nismo dodali fericianida, nismo opazili nobene luminiscence. Luminiscenca pa je bila opažena, tudi če v reakcijsko mešanico nismo dodali H_2O_2 .

4.3.2 Primerjava luminiscence oetne kisline in 5 % TCA

Več podatkov v literaturi kaže na pomen pH pri merjenju luminiscence. Pokazali smo, da je pH pomemben dejavnik, vendar ne nujno najpomembnejši. Preglednica 1 prikazuje luminiscenco oetne kisline (CH_3COOH) s pH vrednostjo 2 in luminiscenco 5 % TCA s pH 1. Kljub višjemu pH-ju ima 5 N CH_3COOH več kot 3,5-krat nižjo luminiscenco, kar je v nasprotju z dejstvom, da luminiscenca narašča z višanjem pH vrednosti. V našem primeru primerjamo luminisenci kislin različnih koncentracij, kar bi morda utegnil biti razlog za razliko v jakosti luminiscence med kislinama. Pokazali smo tudi, da ima luminiscenca dodane dd H_2O (pH~6) v reakcijsko mešanico 3 do 4 -krat višjo luminiscenco od 5 % TCA (pH 1). S tem smo potrdili naraščanje luminiscence z višanjem pH.

Preglednica 1: Primerjava srednje vrednosti luminiscence (v RLU) oetne in trikloroacetne kisline. Luminiscenca je prikazana kot seštevek štirih ciklov. ¹(N = 4) ± S.E., ²(N = 5) ± S.E.

| Kemikalija | pH | Luminiscenca (RLU) |
|-----------------------------|-----|--------------------|
| 5 % TCA ¹ | 1 | 48,0 ± 3,5 |
| 5 N CH_3COOH ² | 1-2 | 12,0 ± 1,05 |

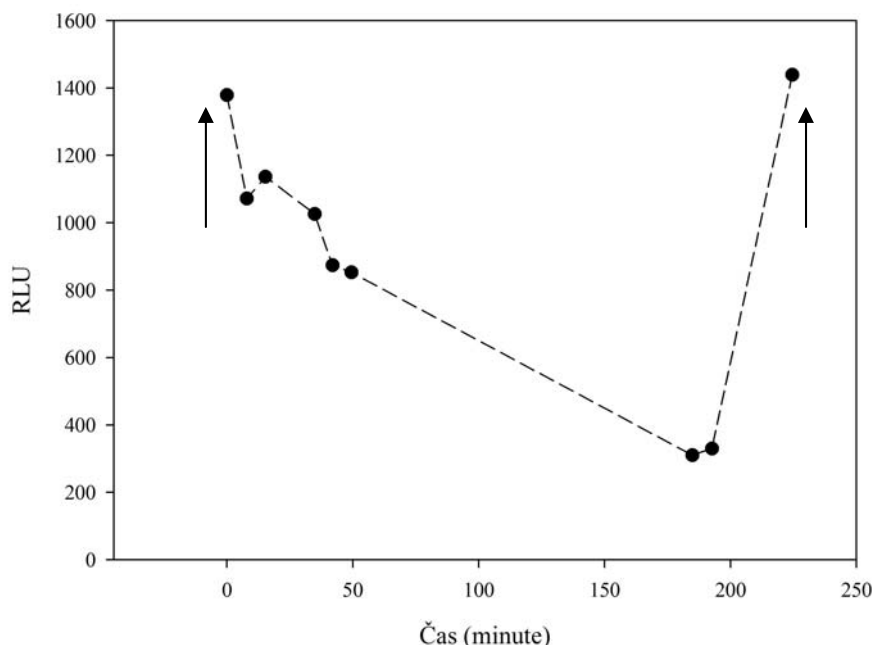
4.3.3 Vpliv redčenja rastlinskega materiala

Poskušali smo ugotoviti ali gre pri čiščenju z DEAE dejansko za vezavo in odstranitev obarvanih produktov ali zgolj za redčitev. Tako smo pripravili ekstrakt, ki smo ga nadalje 10- in 100-krat redčili. Redčitev in dodajanje H_2O_2 je bilo izvedeno na način, da je končna koncentracija H_2O_2 v obeh primerih znašala 10 μM .

Vzorec redčen 100 x je imel 4-krat višjo luminiscenco od 10-krat redčenega, kar nakazuje na izjemen vpliv inhibitornih substanc na luminiscenco, saj se kljub 10-kratnem redčenju inhibitornih substanc luminiscenca poveča le za 4-krat.

4.3.4 Uporaba založne raztopine amonijevega hidroksida in luminola

Da, bi si delo poenostavili smo pripravili sorazmerno raztopino NH_4OH in luminola. Prva puščica prikazuje prvo uporabo raztopine, druga puščica pa meritev, ko smo pripravljeno raztopino zavrgli in odpipetirali najprej amonijev hidroksid, nato pa luminol. Razlog upada luminiscence eneke koncentracije vodikovega peroksida je verjetno v raztapljanju CO_2 . Za nadaljnjo uporabo sorazmerne raztopine se nismo odločili zaradi omenjenih težav.

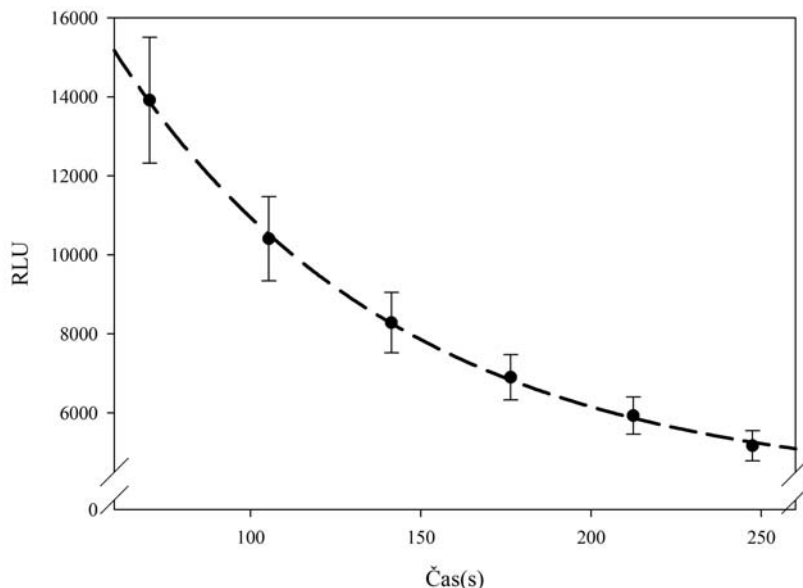


Slika 9: Vpliv časa na upad luminiscence $10 \mu\text{M}$ H_2O_2 izraženega v RLU od priprave založne raztopine luminola in amonijevega hidroksida (prva puščica). Druga puščica prikazuje vrednost luminiscence sveže odpipetiranih kemikalij. Prikazano kot seštevek 4-ih ciklov.

4.4 UPAD LUMINISCENCE

4.4.1 Standard

Znano je, da luminiscenca hitro upada v času. Pokazali smo, da je upad odvisen od številnih dejavnikov. Slika 10 prikazuje eksponencialni upad luminiscence 1 mM H_2O_2 od dodatka katalizatorja (fericianida) in pričetka reakcije.



Slika 10: Luminiscenca 1 mM H_2O_2 standarda v odvisnosti od časa pričetka reakcije do meritve po dodatku katalizatorja ($N = 3$) \pm S.E.

Iz slike 10 je razvidno, da je čas pričetka meritve po dodatku katalizatorja ključnega pomena. V začetni fazi vpeljave metode nas je zanimalo, ali je upad različnih koncentracij H_2O_2 enak ali različen. Zato smo pripravili štiri koncentracije H_2O_2 od 25 do 150 μM in jih dodali v reakcijsko mešanico. Opravili smo po dve meritvi istih vzorcev, pri čemer je bila prva meritev opravljena takoj po odpipetiranju fericianida, druga meritev istih vzorcev pa po 16,3 min po opravljeni prvi meritvi. Iz preglednice 2 je razvidno, da luminiscenca višjih koncentracij H_2O_2 upada hitreje od nižjih. Zanimivo je, da je luminiscenca 150 μM po 16,3 minutah celo nižja od luminiscence 25 μM , čeprav je bila pri prvi meritvi skoraj dvakrat višja.

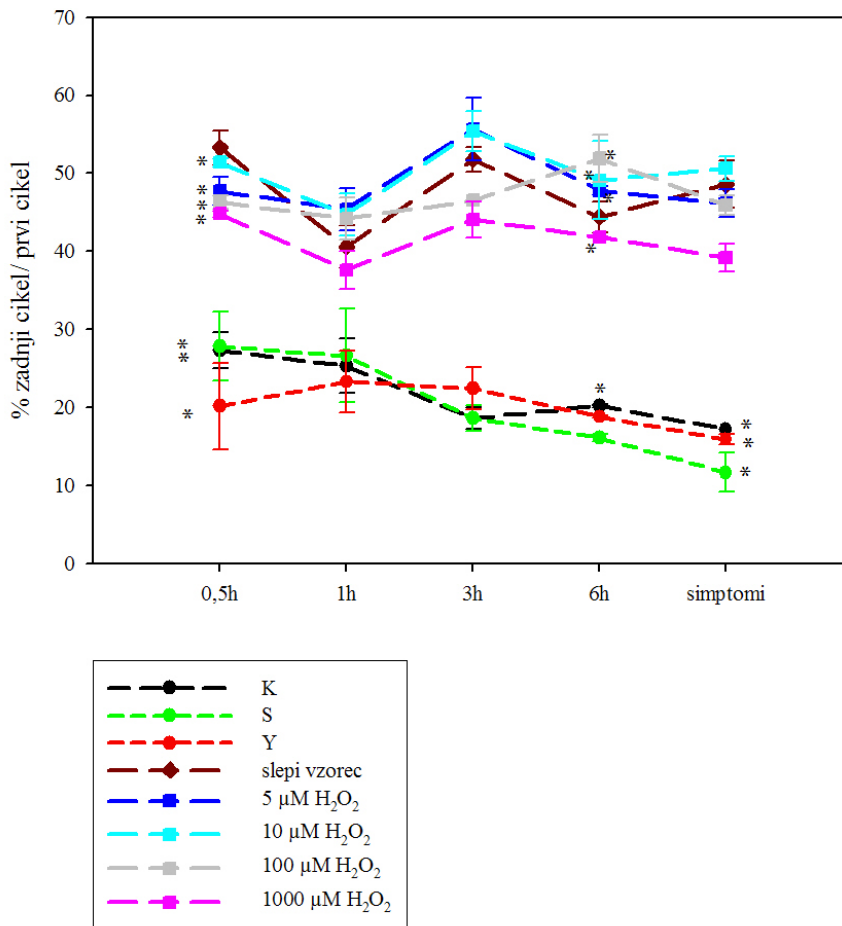
Preglednica 2: Upad luminiscence standarda različnih koncentracij H_2O_2 . Merjeno v dveh različnih časovnih točkah. Prva meritev opravljena po dodatku fericianida in druga meritev po 16,3 minutah po koncu prve.

| | Slepi vzorec | Koncentracija H_2O_2 (μM) | | | |
|------------------|--------------|------------------------------------|------|------|------|
| | | 25 | 50 | 100 | 150 |
| 1. meritev (RLU) | 193 | 871 | 1291 | 2385 | 2063 |
| 2. meritev (RLU) | 72 | 318 | 244 | 233 | 102 |

4.4.2 Rastlinski material

Preverili smo tudi, če obstaja razlika v upadu luminiscence med rastlinskim materialom in standardom. Iz slike 11 je razvidno, da luminiscenca rastlinskega materiala upada hitreje od luminiscence standarda. Pri standardu opazimo, da ima največji upad najvišja koncentracija, najmanjši pa najnižja. Rezultat je prikazan kot razmerje meritve zadnjega

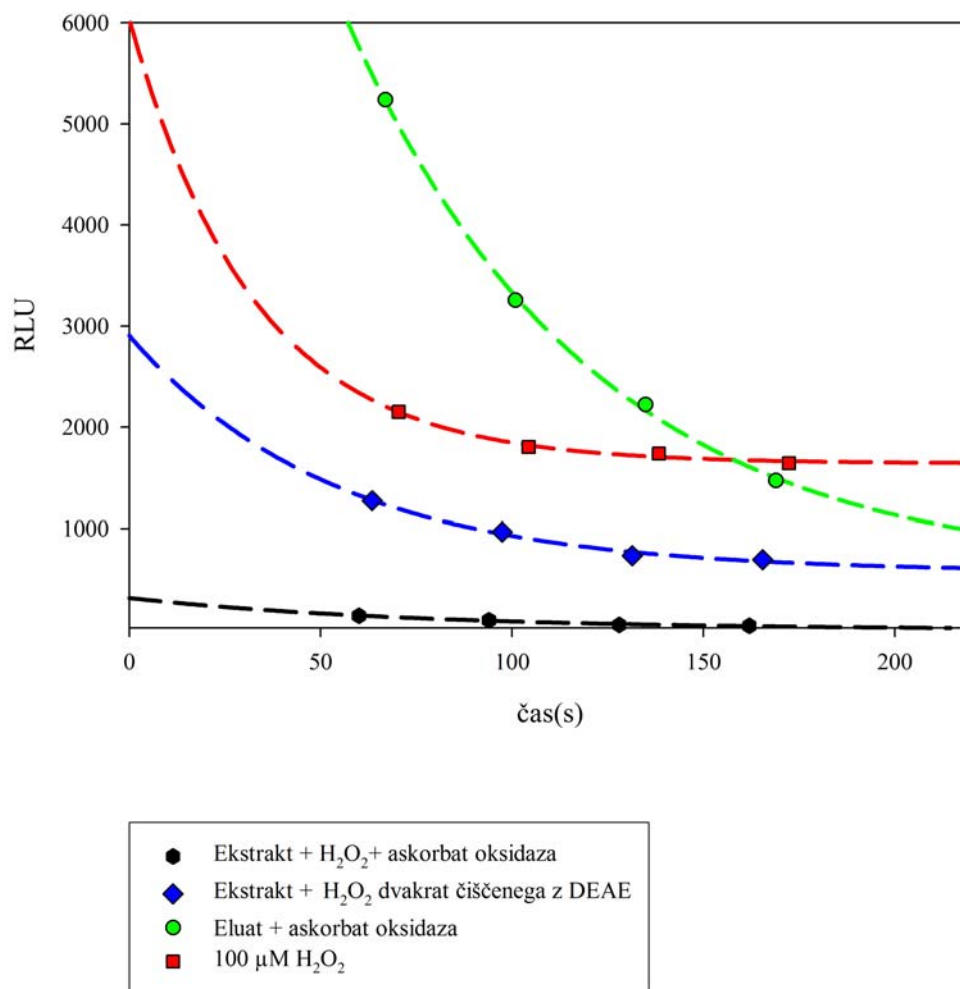
cikla v primerjavi s prvim izraženo v procentih. Zanimivo je nihanje luminiscence ddH₂O (slepi vzorec na sliki 11), ki običajno sledi luminiscenci standarda, saj je le-ta pripravljen v vodi.



Slika 11: Pregled luminiscence zadnjega (šestega) cikla, izražena kot odstotek prvega cikla izmerjenih vrednosti luminiscence kontrolnih rastlin (K), slepo inokuliranih (S) in z virusom PVY okuženih rastlin (Y), ter slepega vzorca (SV) in standarda različne koncentracije (N = 3) ± S.E., * (N = 2) ± S.E.

4.4.3 Vpliv čiščenja rastlinskega materiala na luminiscenco

Zaradi različnega upada luminiscence višjih in nižjih koncentracij standarda smo se odločili, da preverimo, če tudi postopek čiščenja rastlinskega materiala vpliva na upad luminiscence. Slika 12 prikazuje luminiscenco ekstrakta z dodanim H₂O₂. V prvem primeru je bil ekstraktu s H₂O₂ dodan encim askorbat oksidaza. V drugem primeru je bil ekstrakt z dodanim H₂O₂ čiščen z DEAE, nato smo eluat nevtralizirali in mu dodali encim askorbat oksidazo. V tretjem primeru je bil ekstrakt z dodanim H₂O₂ dvakrat čiščen z DEAE. Rezultati kažejo, da najhitreje upada luminiscenca eluatu z dodanim encimom askorbat oksidazo.



Slika 12 : Pregled upada luminiscence različno čistega rastlinskega vzorca.

4.5 UPORABA VEČKANALNE PIPETE

Zaradi izredne občutljivosti metode smo poskušali vpeljati metodo s čim boljšo ponovljivostjo. Tako smo ugotovili, da je v primeru, ko uporabimo večkanalno pipeto za prenos vseh kemikalij na ploščico, kjer poteka meritve štirih vzorcev standarda, standardna napaka med 4 in 5 %. Kadar pipetiranje vseh kemikalij razen fericainida izvedemo z enokanalno pipeto, pa je standardna napaka okoli 14 %. Če odpipetiramo le NH₄OH in K₃Fe(CN)₆ z večkanalno pipeto, vzorec in luminol pa z enokanalno pipeto znaša standardna napaka okoli 6- 7 % srednje vrednosti.

4.6 DODATEK ENCIMA ASKORBAT OKSIDAZE EKSTRAKTU

4.6.1 Obstočnost encimske raztopine

V začetni fazi uvedbe metode smo za inaktivacijo askorbata, prisotnega v rastlinskem materialu, uporabili encim askorbat oksidazo. Pred pričetkom testiranja rastlinskega materiala smo ponovno aktivirali svež encim in izvedli primerjavo med encimom, ki smo ga hranili v hladilniku sedem mesecev in sveže pripravljenim encimom. Opravili smo dve meritvi, pri katerih je bila luminiscenca »starega« encima (aktiviran 7 mesecev pred aktivacijo svežega) v enem primeru za skoraj 40 % nižja od novega v drugem primeru pa za 20 % višja.

4.6.2 Vpliv pH in askorbat oksidaze na luminiscenco

Glede na zgoraj navedene podatke, ki postavijo pod vprašaj uporabo encima, smo se odločili, da preverimo, kakšna je razlika v luminiscenci med eluatom, kateremu pH vrednosti ne uravnamo, eluatom kateremu pH vrednost uravnamo na 6 in eluatom z uravnanim pH na 6 ter dodanim encimom askorbat oksidazo. Preglednica 3 prikazuje, da je luminiscenca eluata s pH vrednostjo 1 najnižja, najvišja pa je luminiscenca eluata s pH 6. Presenetljivo je, da je luminiscenca eluata inkubiranega z encimom nižja od eluata brez encima.

Preglednica 3: Luminiscenca eluata pH 6 in 1 v primerjavi z eluatom rastlinskega vzorca pH 6 inkubiranim z encimom. Luminiscenca je preračunana na čas prve meritve in izražena v RLU.

| | Luminiscenca (RLU) |
|---|--------------------|
| ¹ Eluat pH = 6 + askorbat oksidaza | 320,4 ± 12,0 |
| ² Eluat pH = 6 | 573,5 ± 20,8 |
| ³ Eluat pH = 1 | 183,6 |

¹opravljenih je bilo 5 meritev istega vzorca

²opravljene so bile 3 meritve istega vzorca

³opravljena je bila le ena meritev

Kot je razvidno iz preglednice 3, je razlika v luminiscenci med eluatom z nižjo in višjo pH vrednostjo očitna, zato smo se odločili preveriti, če se luminiscenca poviša tudi v primeru, ko eluatu popravimo pH vrednost na 9,5. Kadar dodamo vzorec s pH 9,5 reakcijski mešanici s pH 9,5, se pH celotne reakcijske mešanice ne spremeni, prav tako se ne bi smela spremeniti luminiscenca, če se le-ta spreminja izključno na račun spremembe pH.

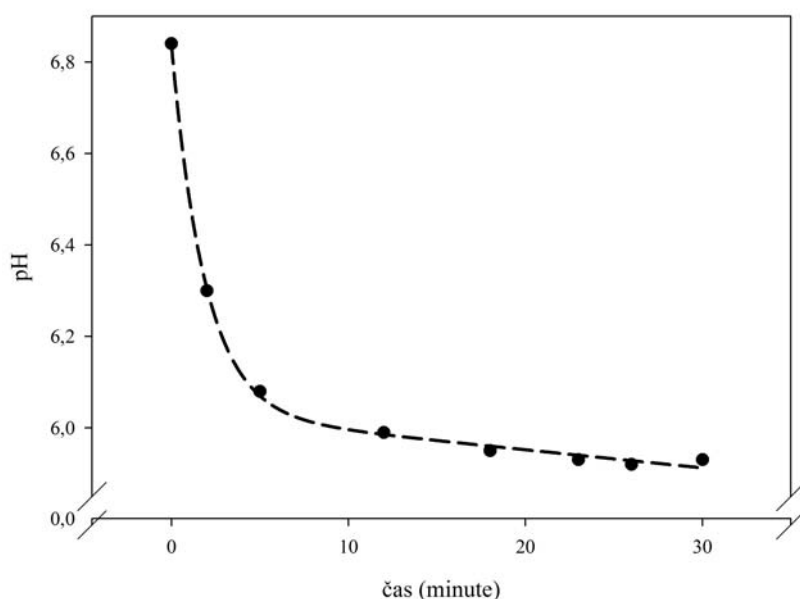
Zanimivo je, da se luminiscenca spremeni, kljub temu da smo v preglednici 5 pokazali, da pH celotne mešanice ostane enak, če dodamo vzorec (ddH₂O) s pH vrednostjo 6.

Preglednica 4: Luminiscenca slepega vzorca (ddH₂O) in eluata rastlinskega vzorca s popravljeno vrednostjo pH na 6,13 in 9,5. Luminiscenca je preračunana na čas prve meritve in predstavljena kot srednja vrednost treh meritev istega eluata s standardno napako.

| | Luminiscenca (RLU) |
|---------------------------|--------------------|
| Eluat pH = 6,13 | 485,7 ± 72,3 |
| Eluat pH = 9,5 | 1570,5 ± 32,1 |
| ddH ₂ O pH = 6 | 441,1 ± 69,8 |

4.6.3 Kemikalije in pH

Dokazali smo, da je pH eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na luminiscenco. Ker H₂O₂ pripravljamo v ddH₂O, smo opravili meritve pH vrednosti ddH₂O in ugotovili, da se pH spreminja od približno 7 do 6. Slika 13 kaže upad pH ddH₂O ob rahlem premešanju pred meritvijo.



Slika 13: Časovni upad pH vrednosti vode.

Preglednica 5 prikazuje pH vrednosti posameznih komponent reakcijske mešanice in pH celotne reakcijske mešanice z ali brez vzorca. Zaradi majhnih volumnov smo pH merili v raztopinah z večjim volumnom. Če dodamo reakcijski mešanici vzorec, npr. vodo s pH ~ 6-7, se pH celotni reakcijski mešanici ne spremeni, če pa dodamo vzorec s pH = 1, pa se pH celotne reakcijske mešanice zmanjša z 9,47 na 9,32.

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

Preglednica 5: pH vrednosti posameznih kemikalij in reakcijske mešanice merjene v sorazmerni raztopini posameznih kemikalij reakcijske mešanice.

| Kemikalija | pH | Temperatura(°C) |
|---|------|-----------------|
| NH ₄ OH | 9,48 | 24,8 |
| luminol | 9,49 | 23,7 |
| K ₃ Fe(CN) ₆ | 9,51 | 23,4 |
| ¹ NH ₄ OH + luminol + K ₃ Fe(CN) ₆ | 9,47 | 24,2 |
| ² NH ₄ OH + luminol + K ₃ Fe(CN) ₆ + 5 %TCA | 9,32 | 24,4 |
| ³ NH ₄ OH + luminol + K ₃ Fe(CN) ₆ + H ₂ O | 9,47 | 24,6 |
| 30% H ₂ O ₂ | 3,13 | 23,0 |
| 10mM H ₂ O ₂ | 6,53 | 23,0 |

¹ V(NH₄OH) = 3,5ml ; V(luminola) = 0,5ml V(K₃Fe(CN)₆) = 0,2ml

² V(NH₄OH) = 3,5ml ; V(luminola) = 0,5ml V(K₃Fe(CN)₆) = 0,2ml ; V(TCA) = 0,5ml

³ V(NH₄OH) = 3,5ml ; V(luminola) = 0,5ml V(K₃Fe(CN)₆) = 0,2ml ; V(H₂O) = 0,5ml

Pokazali smo, da se pH ddH₂O spreminja ob rahlem premešanju mešanice (Slika 13), za kar je najverjetnejši razlog v raztapljanju CO₂. Preverili smo tudi, ali se s časom shranjevanja spreminja pH NH₄OH, ki ob pripravi znaša 10,85, in ugotovili, da po mesecu dni od priprave upade na 9,22. To se odraža tudi v jakosti luminiscence, saj je ob uporabi sveže pripravljene NH₄OH celo za več kot 5-krat višja od luminiscence ob uporabi »starega« NH₄OH. NH₄OH z neuravnanim pH-jem smo uporabljali v začetnih fazah uvedbe metode, v nadaljnjih pa smo pH NH₄OH uravnali s HCl na 9,5.

4.6.4 Primerjava umeritvene krivulje standarda v NH₄OH in vodi

Opazili smo, da je luminiscenca višjih koncentracij H₂O₂ pripravljenih v bolj bazičnem topilu (v 0,2 M NH₄OH s popravljenim pH-jem na 9,5) višja od tiste kjer je H₂O₂ pripravljen v vodi (pH ≈ 6,8). Nižje koncentracije H₂O₂ so bile v bazičnem nižje od tistih v nevtralnem.

4.7 UPORABA RAZLIČNIH METOD ČIŠČENJA EKSTRAKTA

Vpliv različnih metod čiščenja rastlinskega materiala prikazuje preglednica 6. Razlika med samim ekstraktom in ekstraktom čiščenim s PVPP je komaj opazna. Če ekstrakt čistimo z DEAE, opazimo porast luminiscence, ki je višji v primeru, ko predhodno uporabimo še PVPP. Najvišjo luminiscenco dosežemo, če po čiščenju z DEAE eluat nevtraliziramo in inkubiramo z askorbat oksidazo brez predhodne uporabe PVPP. Luminiscenca je rahlo nižja ob uporabi PVPP, kar naj bi bilo pogojeno z odstranitvijo fenolnih snovi, ki lahko ob odsotnosti askorbata, v primeru, ko PVPP ne uporabimo, povzročijo nastanek H₂O₂ (cit. in Veljovic-Jovanovic in sod., 2002). Rezultati so bili pridobljeni pred ugotovitvijo, da gre

najverjetneje porast luminiscence od eluata do nevtraliziranega eluata inkubiranega z askorbat oksidazo na račun spremembe pH vrednosti.

Preglednica 6: Luminiscenca izražena v RLU različno čiščenega rastlinskega vzorca (N=3) ± S.E. Luminiscenca je prikazana kot seštevek 4 ciklov.

| | -PVPP | +PVPP |
|---|----------------|----------------|
| Ekstrakt | 12,76 ± 1,76 | 14,00 ± 1,53 |
| Ekstrakt + H ₂ O ₂ | 55,67 ± 0,67 | 68,33 ± 8,95 |
| Ekstrakt + H ₂ O ₂ + DEAE | 170,00 ± 5,69 | 286,67 ± 39,96 |
| Ekstrakt + H ₂ O ₂ + DEAE + askorbat oksidaza | 470,33 ± 32,54 | 440,00 ± 75,29 |

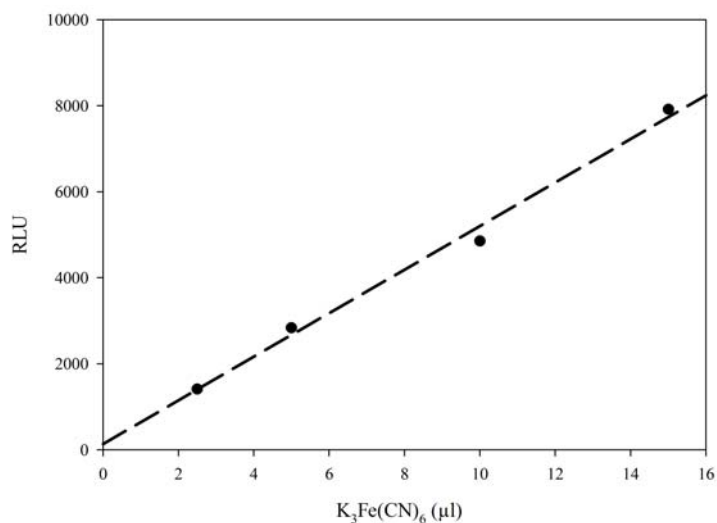
4.8 OPTIMIZACIJA MERJENJA LUMINISCENCE

4.8.1 Vpliv stresanja in volumen fericianida

Podatki kažejo, da je upad luminiscence med drugim odvisen tudi od koncentracij reaktantov, stresanja in časa po dodatku katalizatorja (fericianida) in pričetkom merjenja. Tako je možno s spreminjanjem omenjenih parametrov spreminjati samo luminiscenco. Omenjeni podatki se nanašajo na meritev standarda.

Ugotovili smo, da je tudi stresanje pomemben dejavnik, ki vpliva na luminiscenco. Podatki kažejo, da je najoptimalnejši čas avtomatskega stresanja 4 s. To je čas, pri katerem vse meritve standarda od prvega cikla nadalje upadajo. Pri nepremešani mešanici smo pri standardu opazili tri možne variante; naraščanje luminiscence s časom, naraščanje v začetnih časih nato upadanje in relativno konstantno luminiscenco v času. Pri rastlinskih vzorcih pa smo tudi pri nestresanih vzorčkih opazili le upad luminiscence po ciklih.

Ugotovili smo, da se luminiscenca linearno povečuje z večanjem volumna 0,5 mM fericianida (Slika 14).



Slika 14: Luminiscenca (RLU) v odvisnosti od volumna $K_3Fe(CN)_6$.

4.8.2 Določitev najoptimalnejših nastavitvev aparature

A) Temperatura (T) meritve

Najboljši kompromis je T dvignjena nad T ambienta, tako aparatura Tecan GENios, ki ima možnost le ogrevanja, ne pa tudi aktivnega hlajenja, dogreva komoro. Drugi razlog je čas do pričetka meritve, ki je, kot smo dokazali, pri T 28°C krajši kot pri T ambienta. Merili smo pri T 28°C.

B) Število merjenih vzorcev ene meritve

Mikrotiterska ploščica omogoča hkratno analizo 96 vzorcev in, ker smo pokazali, da zaradi hitrega upada luminiscence rastlinskega materiala hkratna analiza večjega števila vzorcev ni smiselna, je potrebno omejiti število analiziranih vzorcev. Ugotovili smo, da je najoptimalneje meriti 4 vzorce v poljubnem številu ciklov. Pri merjenju rastlinskega materiala so bili vzorci razporejeni vedno po enakem vrstnem redu: 1. luknjica vzorec okuženih rastlin (Y), 2. luknjica vzorec slepo inokuliranih rastlin (S), 3. luknjica vzorec intaktnih rastlin (K), 4. luknjica slepi vzorec (SV) ali standard.

4.8.3 Določitev časa merjenja

Pri merjenju luminiscence je eden izmed najpomembnejših dejavnikov tudi dejanski čas pričetka meritve. Če želimo med seboj primerjati prvo in zadnjo luknjico v eni meritvi, je

potrebno upoštevati čas oz. razliko v času med meritvijo prve in zadnje luknjice. Ta čas pa je odvisen od dolžine same meritve ene luknjice ter časa premika senzorja.

Cikel imenovan tudi kinetični interval je časovni interval v katerem se senzor premakne in opravi meritev iz prve luknjice preko vseh merjenih luknjic nazaj na prvo luknjico. Časovne točke ('Time points') so točke v katerih se je pričel cikel. Prvi cikel se vedno prične v času 0 s, naslednji cikel pa je odvisen od števila vzorcev merenih in času meritve.

Zaradi neobstoja funkcije izpisa dejanskega pričetka meritve posameznega vzorca in zaradi različnih dolžin kinetičnega intervala meritve enakega števila luknjic, pri čemer lahko cikel zaniha od 29 do 46 s (preglednica 7 in preglednica 8), smo predpostavili dva modela premika senzorja. Matematični model slabše razloži številne časovne intervale, zato bo nadalje predstavljen le eksperimentalno določen model premika senzorja.

Preglednica 7: Prikaz dolžine cikla (kinetični interval) v sekundah pri merjenju različnega števila luknjic.

| | Število luknjic | | | | |
|--------------------------------------|-----------------|---------|---------|-----|-----|
| | 1 | 4 | 6 | 8 | 12 |
| Kinetični interval od - do (s) | 23* | 29 - 46 | 30 - 41 | 59* | 59* |
| Časovni interval meritve luknjice | 3 | 3 | 2-3 | 3 | 3 |
| Kin. interval – meritev vseh luknjic | 20 | 17-34 | 18-23 | 35 | 23 |

* opravljena je bila ena meritev

Preglednica 8 : Pregled nihanja časovnih točk ('Time points') 4 vzorcev merjenih v 6-ih ciklih.

| Zaporedna št. cikla | Čas pričetka meritve (s) |
|---------------------|--------------------------|
| 1. cikel | 0 |
| 2. cikel | 32-36 |
| 3. cikel | 65-72 |
| 4. cikel | 97-108 |
| 5. cikel | 132-144 |
| 6. cikel | 162-180 |

4.8.3.1 Eksperimentalno določen model premika senzorja

Eksperimentalno smo določili pričetek meritve prve luknjice oz. prvega vzorca in nadaljnje premike senzorja s pomočjo posnetega zvoka in programa za analizo le-tega.

Pokazali smo, da je čas pričetka meritve prvega vzorca odvisen od nastavitve aparature (temperature), da znaša čas premika senzorja od ene luknjice k drugi približno 0,46 s in da je najpogostejši čas pričetka meritve prvega vzorca okoli 60 s po dodatku katalizatorja. Pokazali smo tudi, da je prva meritev v vsakem ciklu za okoli 200 ms daljša od nadaljnjih meritev in da je izjemno variabilen čas premora pred prvim ciklom, ki zaniha od nekaj

sekund do celo 1,5 min (PRILOGA A). Začetni časi do vključno časa stresanja so informativno prikazani v preglednici 9.

Preglednica 9 : Pregled povprečnih časovnih intervalov do stresanja treh meritev (N=3) ± S.E.

| Opis | Časovni interval (s) |
|--|----------------------|
| Čas od klika gumba »START« do vpotega ploščica | 2,65 ± 0,09 |
| Čas vpotega ploščice | 2,85 ± 0,01 |
| Čas premora po vpotegu ploščice | 0,33 ± 0,01 |
| Čas premika senzorja po vpotegu ploščice | 1,60 ± 0,04 |
| Čas stresanja ploščice | 3,97 ± 0,02 |

4.9 PREGLED IN IZBIRA METODE OBDELAVE PODATKOV

Podatke je možno izračunati in interpretirati na več različnih načinov, vsak izmed njih ima svoje prednosti in slabosti. Pri primerjavi podatkov moramo zagotoviti primerljivost tako v okviru ene meritve, če merimo več vzorcev, kot med dvema različnima meritvama. Zaradi specifičnosti naše aparature in drugih dejavnikov je v našem primeru primernih le nekaj metod.

Metoda primerjave prve meritve prvega cikla vzorca s prvo meritvijo prvega cikla standarda omogoči hitro analizo, vendar ne omogoči dobre primerljivosti večjega števila vzorcev znotraj ene meritve kakor tudi ne primerljivosti med meritvami. Podobno tudi *metodi primerjave vsote vseh ciklov vzorca z vsoto vseh ciklov standarda* in *metoda primerjave ploščine* ne omogočata dobre primerljivosti zaradi časovnih razlik, ki jih povzroči človek ali aparatura. Šele *metoda izračuna luminiscence na čas meritve prvega vzorca*, s katero preračunamo luminiscenco poljubnega vzorca znotraj meritve na čas meritve prvega vzorca omogoči primerjavo med vzorci znotraj ene meritve. *Metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s* pa omogoči bolj pravilno in točnejšo primerjavo različnih vzorcev tako znotraj ene meritve kot med meritvami.

Najprimernejši metodi obdelave podatkov sta *metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s* in *metoda primerjave ploščin*. *Metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s* upošteva bistveno lastnost, razliko v upadu med luminiscenco rastlinskega materiala in standardom oz. slepim vzorcem (SV) in je edina metoda, ki omogoča določitev H₂O₂ v rastlinskem materialu. *Metoda primerjave ploščin* pa je v našem primeru primerna le za primerjavo rastlinskega materiala, ki ima relativno podoben upad. Metoda temelji na izračunu ploščine pod krivuljo $Y = Ae^{-bx}$ in primerjavo ploščine slepo inokuliranih (S) in okuženih rastlin (Y) s ploščino kontrolnih rastlin (K). Vrednost Y_0 v vseh primerih zanemarimo, ker predstavlja bolj ali manj podobno vrednost približevanja luminiscence.

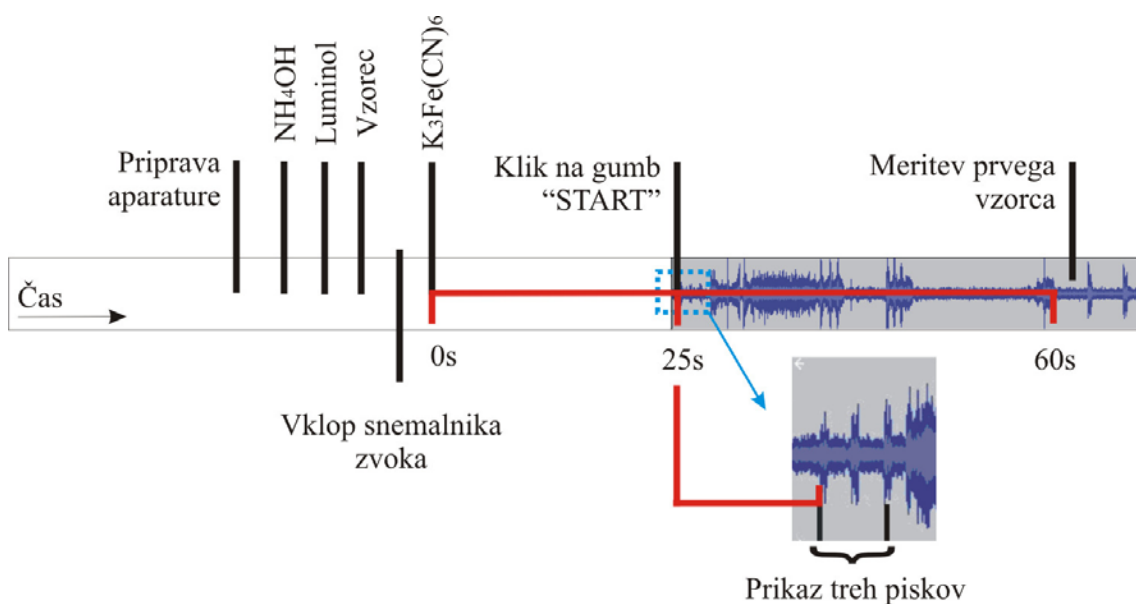
Vsaka izmed metod je natančneje in na primeru izračuna predstavljena v prilogi (PRILOGA B). Preglednica 10 predstavlja povzetek vseh metod, ko za izračun uporabimo iste podatke.

Preglednica 10: Povzetek rezultatov različne obdelave istih podatkov ($N=3$) \pm S.E. Metoda primerjave prve meritve prvega cikla vzorca s prvo meritvijo prvega cikla standarda (1. metoda), metoda primerjava vsote vseh ciklov vzorca z vsoto vseh ciklov standarda (2. metoda), metoda primerjave ploščine vzorca s ploščino standarda (3. metoda), in metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s (4. metoda).

| | 1. metoda | 2. metoda | 3 .metoda | 4. metoda |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Aver. ($\frac{\text{vzorec}}{\text{standard}}$) | 0,753 | 0,517 | 0,358 | 1,135 |
| S.E | 0,179 | 0,125 | 0,120 | 0,205 |
| %(S.E/ povprečje) | 23,8 | 24,08 | 33,47 | 18,7 |

4.10 POVZETEK RAZMER ZA MERJENJE LUMINISCENCE H_2O_2 V RASTLINSKEM MATERIALU

Ekstrakcijo smo izvedli v 4 ml 5 % TCA kot je opisano v poglavju Metode in materiali. Vse kemikalije so bile odpipetirane vedno v enakem vrstnem redu in z uporabo večkanalne pipete. Najprej smo pripravili aparaturo za merjenje luminiscence, nato pa smo v mikrotitersko ploščico odpipetirali: 175 μ l 0,2 M NH_4OH , 25 μ l 1 mM luminol, 25 μ l analiziranega vzorca in 10 μ l 0,5 mM fericianida. Pred pričetkom reakcije s fericianidom smo vključili snemalnik zvoka. Čas 0 s (Slika 15) predstavlja pričetek reakcije in predstavlja čas, na katerega smo preračunali vrednost luminiscence. V času 25 s smo prenesli mikrotitersko ploščico do aparature in po preteku 25 s s klikom na gumb »START« pričeli z meritvijo. Dejanska meritev prvega vzorca je potekla po približno 60 s od pričetka reakcije. Iz slike 15 je razviden tudi trojni signal – pisk, kjer prvi pisk naznanja pretečenih 25 s.



Slika 15: Shematski prikaz od priprave aparature do meritve prvega vzorca.

4.11 DOLOČITEV VODIKOVEGA PEROKSIDA V RASTLINSKEM MATERIALU

4.11.1 Izkoristek

Da bi ugotovili morebitno izgubo H_2O_2 po nanosu na kolono, smo namesto rastlinskega vzorca na kolono nanegli 1 ml 100 μM H_2O_2 pripravljene v dd H_2O in eluirali z 3,5 ml 5 % TCA. Končna koncentracija H_2O_2 preračunana na 3,5 ml eluata je znašala 28,6 μM .

Pri vseh treh meritvah smo opazili, da je luminiscenca samega standarda (30 μM H_2O_2) odpipetiranega direktno na mikrotitersko ploščico za okoli 2-krat nižja od luminiscence eluata s koncentracijo 28,6 μM H_2O_2 . Standard predstavlja v vodi pripravljen H_2O_2 . Eluat pa predstavlja standard nanešen na kolono, eluiran z 5 % TCA in nevtraliziran s K_2CO_3 . Zaradi nejasnosti podatkov smo se odločili, da pripravimo različne koncentracije H_2O_2 tudi v 5 % TCA nevtralizirani s K_2CO_3 .

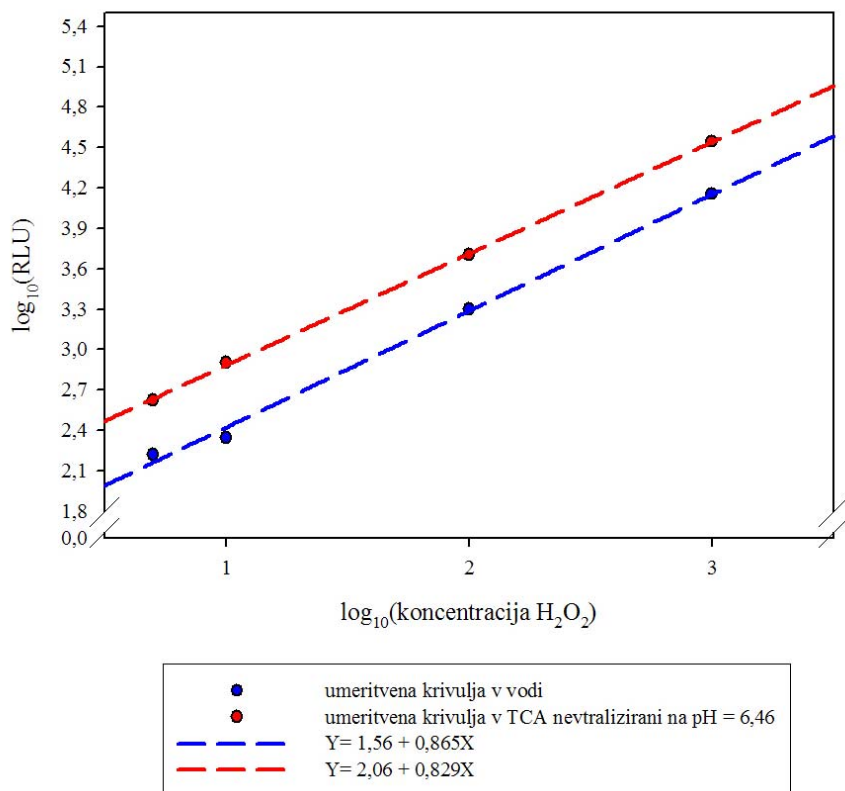
Ugotovili smo, da je luminiscenca 5 % TCA nevtralizirane s K_2CO_3 približno 2-krat višja od luminiscence enakih koncentracij standarda v dd H_2O . Med slepima vzorcema, kjer v enem primeru uporabimo dd H_2O , v drugem pa nevtralizirano 5 % TCA, ni bistvenih razlik (preglednica 11). Slika 16 prikazuje obe premici umeritvene krivulje in še jasneje pokaže razliko v luminiscenci.

Preglednica 11: Pregled luminiscence H_2O_2 pripravljene v 5% TCA nevtralizirani na pH 6.46 in H_2O_2 pripravljene v dd H_2O . V oklepaju so odštete povprečne vrednosti luminiscence vode.

| opis | nevtralizirana 5% TCA | dd H_2O |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | čas 0 s (RLU) ² | čas 0 s (RLU) ¹ |
| 5 μM | 576,2(419,3) | 323,7(166,8) |
| 10 μM | 960,6(803,7) | 380,4(223,5) |
| 100 μM | 5201,4(5044,5) | 2163,5(2006,6) |
| 1000 μM | 35261,9(35105) | 14438,0(14281,1) |
| SV ^{H₂O} | / | 156,9±26,2 |
| SV ^{TCA} | 131,2 | / |

¹povprečje dveh meritev

²opravljena ena meritev



Slika 16: Prikaz umeritvene krivulje pripravljene v vodi in v nevtralizirani 5 % TCA.

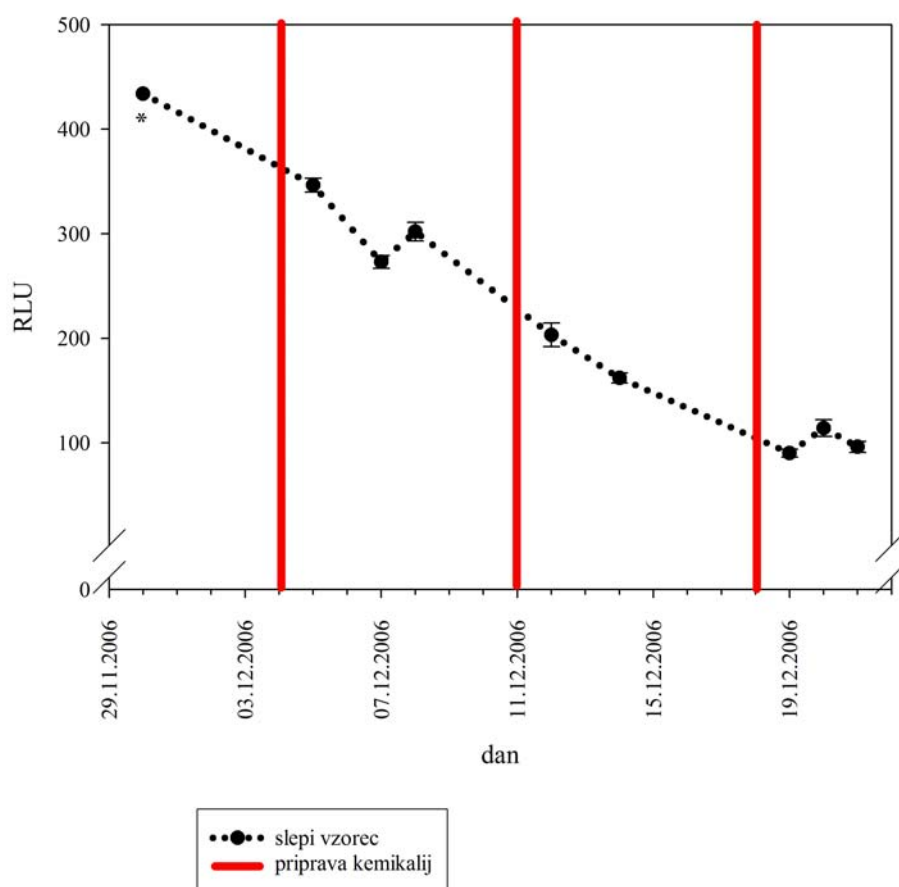
Določitev koncentracije H_2O_2 in posledično izkoristka je odvisna od priprave standarda. Opravili smo tri meritve, pri čemer je bila prva meritev opravljena 8 dni pred nadaljnjima dvema.

Če za določitev koncentracije H_2O_2 uporabimo umeritveno krivuljo standarda pripravljenega v vodi in če upoštevamo vse tri meritve izkoristka, potem določimo eluatu koncentracijo $121,7 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ namesto preračunanih $28,6 \mu\text{M}$, kar bi pomenilo 426% izkoristek. V primeru umeritvene krivulje standarda v nevtralizirani 5 % TCA ob upoštevanju vseh treh meritev določimo koncentracijo $37,6 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (131,6% izkoristek).

Kot je prikazano na sliki 17, je luminiscenca slepega vzorca (SV) upadala, zato je realneje za izračun izkoristka uporabiti dve meritvi opravljeni v istem dnevu in ju primerjati z umeritveno krivuljo v nevtralizirani 5 % TCA prav tako pripravljeno v istem dnevu. V tem primeru dobimo izkoristek 107,1 % .

4.11.2 Pregled manjšanja jakosti luminiscence slepega vzorca

Pri pregledu meritev slepega vzorca smo ugotovili, da se je luminiscenca slepemu vzorcu (SV) tekom eksperimentalnega dela manjšala. Slika 17 prikazuje upad luminiscence SV (pikčasta črta) iz več kot 400 RLU na manj kot 100 RLU. Da bi ugotovili možen razlog, smo najprej pomislili na možen upad zaradi starosti kemikalij. Pokončne rdeče črte na sliki prikazujejo dan priprave kemikalij. Kot drugi verjetni razlog za upad pa smo predpostavili spremembe v ddH₂O. Točnega vzroka upada luminiscence slepega vzorca nismo našli.



Slika 17: Pregled upada meritve luminiscence slepega vzorca od 30.11 – 21.12. (N > 5) ± S.E., razen * (N=2).

4.11.3 H₂O₂ v rastlinah

Postopek meritve H₂O₂ v rastlinskem materialu je potekal kot je opisan pod 4.10. Analizirali smo spodnje liste občutljive sorte 'Igor', ki smo jih pobrali v različnem času po inokulaciji oz. v ustrežajočih časih v primeru intaktnih rastlin.

Zaradi opaženega upada slepega vzorca razvidnega iz slike 17 je rezultate meritev rastlinskega materiala potrebno predstaviti na drugačen način kot le z nanosom vrednosti na graf (Slika 18). Rezultate je bolje predstaviti na način, ko kontrolo (K) odštejemo od slepo inokuliranih (S) in okuženih rastlin (Y). S tem se izognemo časovnemu nihanju luminiscence tekom določanja H_2O_2 (Slika 19). Realnejšo predstavitev dogajanja v rastlini pa dobimo iz slike 20, kjer je prikazano razmerje med ploščinami luminiscenc. Iz preglednice 12 je razviden vrstni red testiranja rastlinskega materiala. Opazimo lahko, da luminiscenca rastlinskih vzorcev v nobenem primeru ne preseže luminiscence slepega vzorca (SV) in tako niti v enem primeru ne določimo koncentracije endogenega H_2O_2 . Preglednica 13 pa prikazuje na čas 0 s izračunane srednje vrednosti luminiscence in koncentracije H_2O_2 , kjer nam je določitev v rastlinskem materialu uspela.

Preglednica 12: Pregled izmerjenih vrednosti luminiscence (v RLU) umeritvene krivulje, slepega vzorca (SV) in rastlinskega materiala kontrolne skupine (K), slepo inokulirane skupine (S) in okužene skupine (Y). Za SV ($N > 8$) \pm S.E., *¹ ($N = 8$) \pm S.E. Za K, S, Y in umeritveno krivuljo s srednjo vrednostjo ($N = 3$) \pm S.E., oz.* ($N = 2$) \pm S.E.

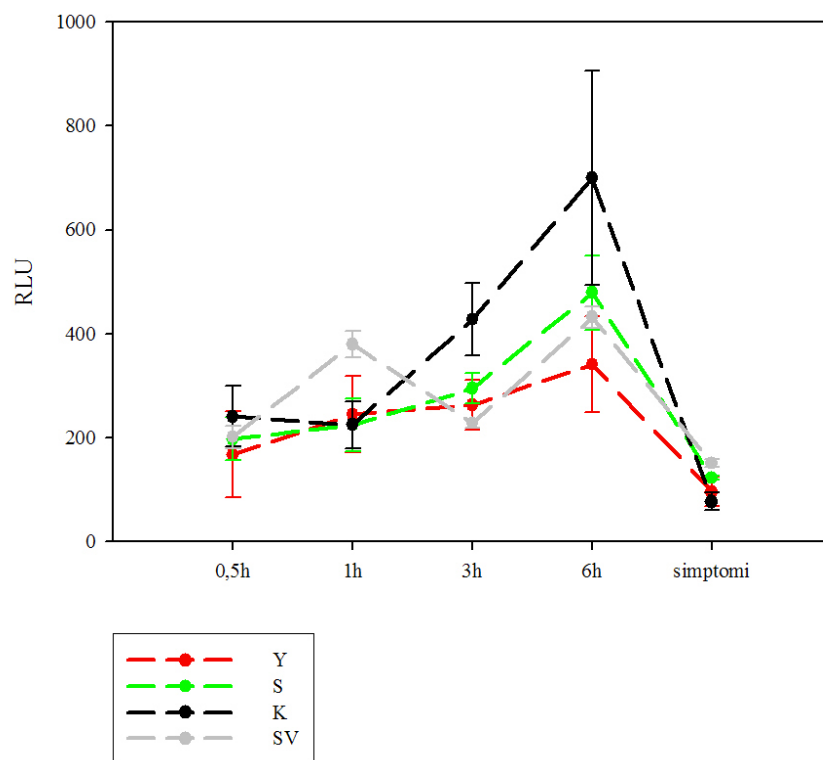
| | 6h | | 1h | | 3h | | SIMPTOMI | | 0,5h | |
|--------------|---------|--------|---------|--------|---------|-------|----------|--------|---------|---------|
| | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E |
| SV | 288,2 | 7,4 | 203,5 | 11,3 | 162,0 | 4,9 | 90,3 | 3,8 | 114,1 | 8,1 |
| 5 μ M | 483,5 | 3,5* | 375,7 | 30,7 | 321,0 | 36,7 | 181,7 | 13,3 | 208,0 | 8,0* |
| 10 μ M | 678,0 | 103,9* | 472,3 | 22,8 | 432,3 | 54,6 | 270,7 | 8,7 | 299,5 | 4,5* |
| 100 μ M | 2374,0 | 150,0* | 2650,3 | 263,3 | 2157,0 | 79,2 | 1760,7 | 96,9 | 1823,5 | 95,5* |
| 1000 μ M | 14874,5 | 689,4* | 13916,7 | 1593,2 | 10429,0 | 874,7 | 13383,0 | 1441,9 | 13151,5 | 1358,5* |
| Y (RLU) | 111,6 | 27,7 | 109,3 | 24,2 | 131,3 | 33,2 | 28,0 | 2,0* | 50,0 | 11,0* |
| S (RLU) | 149,0 | 13,3 | 95,0 | 18,2 | 127,3 | 14,5 | 39,5 | 4,9* | 54,5 | 7,5* |
| K (RLU) | 311,5 | 83,5* | 87,7 | 14,5 | 149,7 | 35,4 | 29,0 | 0* | 46,5 | 21,9* |

* ($N=2$), *¹($N=8$)

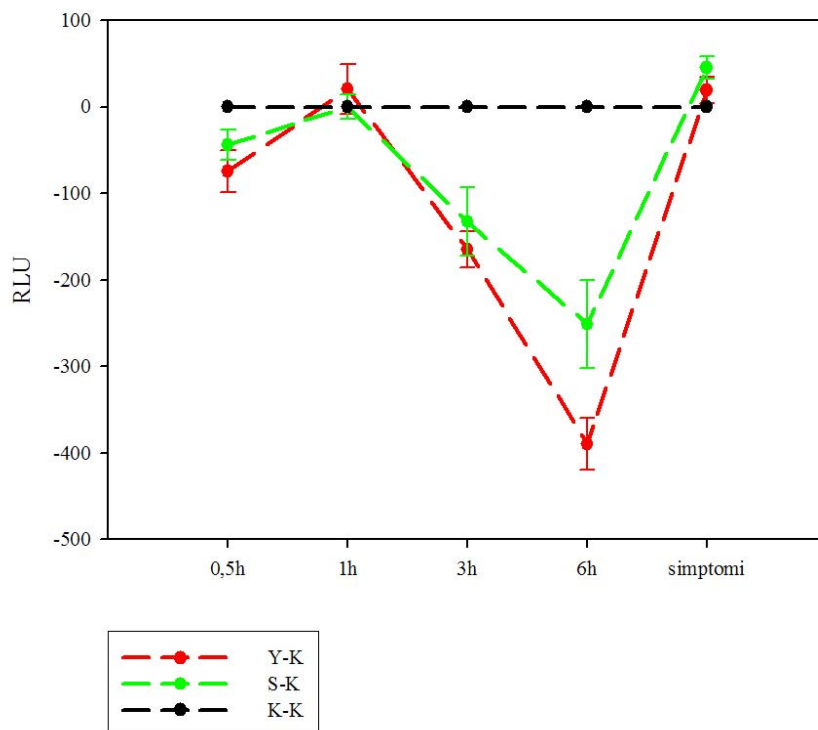
Preglednica 13: Pregled na čas 0 s izračunanih vrednosti luminiscence (v RLU) umeritvene krivulje, slepega vzorca (SV) in rastlinskega materiala kontrolne skupine (K), slepo inokulirane skupine (S) in okužene skupine (Y) s srednjo vrednostjo SV ($N > 8$) \pm S.E., in *¹ ($N = 8$) \pm S.E., ter ($N = 3$) \pm S.E., oz* ($N = 2$) \pm S.E. za K, S, Y in vrednosti standarda.

| | 6h | | 1h | | 3h | | SIMPTOMI | | 0,5h | |
|--------------|----------------------|---------|---------|--------|----------------------|--------|----------|--------|----------------------|--------------------|
| | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E | Aver. | S.E |
| SV | 431,6 | 20,9 | 380,3 | 25,3 | 227,8 | 8,9 | 150,9 | 7,8 | 201,7 | 21,8* ¹ |
| 5 μ M | 707,5 | 23,8* | 593,5 | 55,1 | 417,1 | 72,2 | 297,1 | 21,4 | 310,3 | 0,4* |
| 10 μ M | 1051,8 | 246,2* | 732,5 | 47,2 | 572,9 | 91,4 | 434,4 | 14,7 | 461,0 | 23,1* |
| 100 μ M | 3496,5 | 428,6* | 4138,6 | 528,3 | 3307,4 | 131,2 | 3001,7 | 173,9 | 2809,6 | 62,9* |
| 1000 μ M | 25604,7 | 1148,7* | 27314,2 | 4120,1 | 17553,4 | 1845,5 | 25627,6 | 2904,1 | 22689,0 | 1628,1* |
| Y (RLU) | 341,1 | 92,3 | 245,3 | 74,2 | 262,9 | 48,6 | 95,9 | 28,7* | 167,3 | 83,1* |
| S (RLU) | 479,0 | 71,9 | 224,5 | 51,1 | 294,9 | 29,8 | 122,5 | 3,6* | 197,8 | 41,6* |
| K (RLU) | 699,7 | 205,4* | 224,7 | 45,2 | 427,6 | 69,1 | 76,9 | 16,7* | 241,7 | 58,8* |
| Y (μ M) | / | / | / | / | 1,74 ³⁽²⁾ | 0,87* | / | / | 2,02 ²⁽¹⁾ | / |
| S (μ M) | 1,61 ³⁽²⁾ | 0,74* | / | / | 1,49 ³⁽³⁾ | 0,74 | / | / | 1,56 ²⁽¹⁾ | / |
| K (μ M) | 4,80 ²⁽²⁾ | 3,96* | / | / | 5,21 ³⁽³⁾ | 1,99 | / | / | 4,11 ²⁽¹⁾ | / |

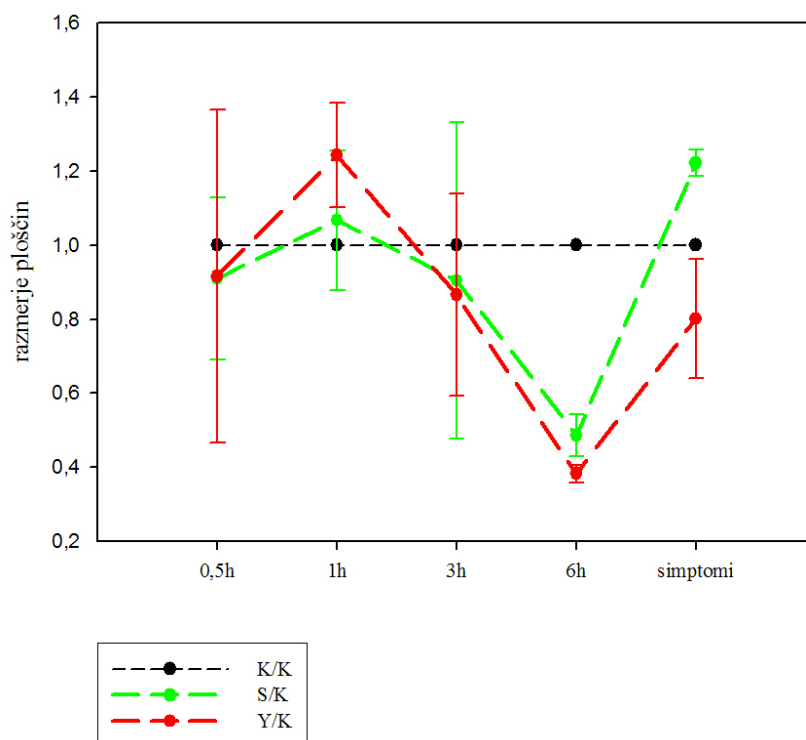
* ($N=2$), *¹($N=8$), ^{1,2,3} število paralelnih meritev, ^(1,2,3) število meritev kjer smo določili vodikov peroksid



Slika 18: Prikaz na čas 0 s preračunanih vrednosti luminiscence okuženih (Y), slepo inokuliranih (S) in kontrolnih rastlin (K), ter slepega vzorca (SV). Za SV ($N > 8$) \pm S.E in za K, Y, S ($N = 2$ do 3) \pm S.E.



Slika 19: Luminiscenca okuženih (Y) in slepo inokuliranih (S) listov z odšeto vrednostjo luminiscence kontrolnih listov (K) v času 0 s. ($N = 2$ do 3) \pm S.E.



Slika 20: Srednja vrednost razmerja ploščin luminiscence slepo inokulirane in intaktne skupine (S/K) in okužene in intaktne skupine (Y/K) ($N = 2$ do 3) \pm S.E.

Luminiscenca rastlinskega materiala vsake časovne točke je bila merjena trikrat, razen v primerih, ko rastlinskega materiala ni bilo dovolj : 0,5 h (Y, K, S), 6 h (K) in simptomi (K,S,Y). V omenjenih primerih je bila meritev luminiscence ponovljena v dveh paralelkah.

Pri rastlinah kontrolne skupine (K) smo določili variabilne koncentracije H_2O_2 , vendar pa koncentracije niso presegle $145,9$ nmol H_2O_2 na gram sveže listne mase. Povprečje koncentracij H_2O_2 vseh uspešnih meritev kontrolne skupine tako znaša $131,9 \pm 83,5$ nmol/g sveže mase rastlinskega materiala.

5 RAZPRAVA

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv najpomembnejših dejavnikov na rezultat meritve

Iz sheme na sliki 8 je razvidno, da na luminiscenco vplivajo številni dejavniki, zato je bila ponovljivost predvsem pri začetnih meritvah slabša. Številni dejavniki vplivajo drug na drugega ter tako še ojačijo končen vpliv na luminiscenco.

5.1.2 Optimizacija postopka ekstrakcije

Ker je metoda merjenja H_2O_2 z luminiscenco izredno občutljiva in ker rastlinski material vsebuje snovi, ki lahko motijo meritve, smo sprva poskušali ugotoviti, kaj vse lahko vpliva na rezultat meritve.

5.1.2.1 Volumen ekstrakcije

Volumen ekstrakcije ima pomembno vlogo pri zaznavanju in določanju H_2O_2 . Z večjimi volumni razredčimo snovi, ki dušijo luminiscenco, obenem pa zmanjšamo koncentracijo H_2O_2 in tako zmanjšamo luminiscenco. Postavlja se vprašanje, kaj ima večji vpliv na samo določanje H_2O_2 ; zmanjšanje luminiscence zaradi razredčitve H_2O_2 ali povečanje luminiscence zaradi razredčitve dušilcev. V literaturi zasledimo podatke, da lahko določene spojine v izredno nizkih koncentracijah povzročijo tudi do 50 % zmanjšanje luminiscence (Veljovic-Jovanovic in sod., 2002). Da bi odstranili čim več motečih snovi, smo vzorcem pri ekstrakciji dodali PVPP, ki veže fenolne spojine, in nadalje ekstrakt čistili z ionskim izmenjevalcem DEAE.

5.1.2.2 Centrifugiranje

Za ugotavljanje vpliva centrifugiranja na luminiscenco smo se odločili, ker smo v literaturi zasledili različne hitrosti centrifugiranja. Warm in Laties (1982) sta centrifugirala 30 min pri 12.000 g, Veljovic-Jovanovic in sod. (2002) 10 min pri 12.000 g in nato ponovno 5 min pri 1000 g. Pérez in Rubio (2006) sta centrifugirala enkrat 15 min pri 13.000 g. Orozco-Cárdenes in Rayn (2002) pa sta opravila centrifugiranje po ekstrakciji 10 min pri 10.000 g

in nato po nevtralizaciji supernatanta 2 min pri 3000 g. Po enakem principu so centrifugirali tudi Rao in sodelavci (2000). Lopez-Delgado in sod. (1998) pa so centrifugirali 20 min pri 1400 g.

Zanimivo je, da že samo centrifugiranje vpliva na luminiscenco. Zakaj se luminiscenca spremeni, ni znano. Lahko da je razlog v boljšem usedanju inhibitornih spojin, ki absorbirajo svetlobo v valovnih dolžinah luminiscence, ali v boljšem usedanju antioksidantov oz. drugih dušilcev luminiscence. V našem primeru se je kot ustrežnejše izkazalo centrifugiranje pri višjih obratih.

5.1.2.3 Volumen elucije

Elucija po nanosu vzorca na kolono ima enak učinek kot volumen ekstrakcije. Obenem redči naš vzorec in igra pomembno vlogo pri izpiranju vodikovega peroksida iz kolone. Pokazali smo, da je v primeru uporabe 1g DEAE najoptimalnejši volumen 7 ml.

5.1.3 Luminiscenca

5.1.3.1 Primerjava luminiscence očetne kisline in 5 % TCA

Razlika med luminiscenco očetne kisline (CH_3COOH) in luminiscenco 5 % TCA nas je presenetila. Znano je namreč, da je luminiscenca odvisna od pH vrednosti, vendar pa je, kot je razvidno iz našega primera (preglednica 1), luminiscenca v primeru 5 N CH_3COOH , ki ima pH 2, močno nižja kot v primeru 5 % TCA, ki ima pH 1. 5 % TCA ima skoraj 3,6-krat višjo luminiscenco od očetne kisline. Razlog za to bi morda lahko iskali v različni koncentraciji kislin, saj primerjamo kislino različnih koncentracij ali pa v spremenjenem poteku reakcije, absorpciji očetne kisline ali čem drugem.

5.1.3.2 Vpliv redčenja rastlinskega materiala

Luminiscenca 100-krat redčenega vzorca je običajno 4-krat višja od luminiscence 10-krat redčenega vzorca, kar potrди našo hipotezo, da se z redčenjem vzorca manjša vpliv dušilcev. Primerjava je možna, ker je tako v primeru 10-krat redčenega vzorca kot 100-krat redčenega vzorca bila dodana takšna koncentracija vodikovega peroksida, da je končna koncentracija v obeh primerih znašala 10 μM .

Torej bi z desetkratnim redčenjem vzorca 10-kratno redčili koncentracijo H_2O_2 , vendar bi s tem pridobili le 4-krat višjo luminiscenco na račun razredčitve dušilcev in 10-kratno znižanje zaradi razredčitve H_2O_2 . Odnosi redčenja verjetno niso linearni.

Pokazali smo, da v primeru uporabe fericianida redčitev rastlinskega materiala ne predstavlja učinkovitejše zaznave H_2O_2 . Pérez in Rubio (2006) pa sta predstavila novo poenostavljeno metodo določanja H_2O_2 v rastlinskem materialu. Metoda v osnovi temelji na zamenjavi katalizatorja fericianida s kobaltom (Co (II)), kar ojača luminiscenco za tri velikostne razrede. Takšna ojačitev signala omogoči razredčitev ekstrakta in s tem zaznavo oz. določitev H_2O_2 v ekstraktu, kjer prej zaradi višjih koncentracij inhibitornih substanc ni bila možna. V začetnih fazah smo poskušali zamenjati fericiaid s kobaltom, vendar ojačanja luminiscence nismo zasledili.

5.1.3.3 Uporaba založne raztopine amonijevega hidroksida in luminola

Da bi metodo poenostavili, smo pripravili sorazmerno mešanico med NH_4OH in luminolom, vendar pa smo pri merjenju opazili, da so se vrednosti luminiscence enake koncentracije standarda pričele nižati (Slika 9). Možni razlogi za upad luminiscence so v hitrejši oksidaciji luminola ali v raztapljanju ogljikovega dioksida in nižanju pH vrednosti. Po menjavi kemikalij je jakost luminiscence dosegla jakost prve meritve, pri kateri smo uporabili mešanico luminola in NH_4OH . V tem času amonijev hidroksid še ni bil uravnan na pH 9,5.

5.1.4 Upad luminiscence

5.1.4.1 Standard

Iz slike 10 je razviden eksponencialni upad luminiscence. Luminiscenca upada po krivulji $Y = Y_0 + Ae^{-bx}$. Opazno je tudi manjšanje standardne napake od začetnih časov (bolj variabilno) do končnih časov (manj variabilno). Podatek o upadu luminiscence je izrednega pomena v primeru uporabe čitalca mikrotiterskih ploščic in hkratne analize večjega števila vzorcev. Kadar sprožimo reakcijo istočasno v vseh merjenih luknjicah mikrotiterske ploščice, merimo pa jih v časovnih razmakih, napačno določimo koncentracijo H_2O_2 . Če ne upoštevamo upada luminiscence, med merjenimi luknjicami narašča časovna razlika med vzorci, ki znaša v primeru merjenja 96 vzorcev in upoštevanja 3 s meritve vzorca med prvim in zadnjim vzorcem 288 s.

Pri začetnih meritvah smo opazili, da so nižje koncentracije vodikovega peroksida imele višjo luminiscenco, višje koncentracije pa nižji rezultat. Nerazumljivost smo rešili šele s poskusom prikazanim v preglednici 2, kjer smo pokazali, da je bistven dejavnik tudi čas začetka meritve po odpipetiranju fericianida. Jasno se pokaže, da je upad luminiscence v časovni enoti pri višjih koncentracijah vodikovega peroksida večji kot pri nižjih. Če merimo vzorce standarda različnih koncentracij dvakrat in je prva meritev opravljena takoj po dodatku katalizatorja (fericianida), druga meritev pa po določenem časovnem intervalu, lahko luminiscenca višjih koncentracij upade pod luminiscenco nižjih koncentracij vodikovega peroksida.

5.1.4.2 Rastlinski material

Slika 11 še jasneje predstavi razliko v upadu luminiscence tako pri meritvah rastlinskega materiala kot tudi standarda. Krivulje standarda in rastlinskega materiala so jasno ločene, s tem da ima rastlinski material višji upad od standarda. Pri standardu opazimo, da je v vseh primerih najnižja krivulja z najvišjo koncentracijo vodikovega peroksida (1 mM), nekje na sredi se nahaja krivulja 100 μM , nad njo pa 5 in 10 μM koncentraciji vodikovega peroksida. Zanimiva je krivulja slepega vzorca, ki pri testiranju rastlinskega materiala kar močno niha. Opazimo tudi, da vse krivulje standarda bolj ali manj nihajo s krivuljo slepega vzorca, torej z luminiscenco vode (ddH_2O). Pri rastlinskem materialu za razliko od standarda temu ni tako, čeprav se nihanje luminiscence vode verjetno tudi odraža, vendar ne v tolikšni meri.

5.1.4.3 Vpliv čiščenja rastlinskega materiala na luminiscenco

Bistvena težava, ki se je pojavila pri našem raziskovalnem delu, je bila, kako določiti koncentracijo H_2O_2 iz danih merjenih podatkov (Slika 12). Težava se namreč nanaša na podatek, da je jakost luminiscence pri različno čistem materialu najvišja, kadar uporabimo encim askorbat oksidazo za oksidacijo askorbata v dehidroaskorbat, vendar pa je v tem primeru tudi upad luminiscence najvišji. Kako sedaj primerjati tak rastlinski material? Če vzamemo za primer sam ekstrakt z dodanim H_2O_2 in encimom in ga primerjamo s krivuljo standarda, ugotovimo, da se bistveno ne zmotimo, če vzamemo katerokoli izmed štirih meritev ekstrakta z dodanim H_2O_2 in jo primerjamo z ustrežajočo meritvijo standarda. Podobno opazimo tudi v primeru 2-krat preko DEAE čiščenega eluata. Vendar pa v primeru eluata z dodanim encimom opazimo bistveno razliko. Tu namreč ni vseeno, katero meritev eluata z encimom primerjamo z ustrežajočo meritvijo standarda. Če samo na hitro pregledamo rezultate, opazimo, da v primeru primerjave prve meritve dobimo približno 2,5-krat višjo luminiscenco napram standardu, v primeru zadnje meritve pa npr. samo 80 %

vrednosti standarda. Ob tem spoznanju je bilo nujno razviti metodo, ki bi ponudila najboljši rezultat ob upoštevanju različnega upada luminiscence vzorcev in omogočila primerjavo vzorcev znotraj ene meritve in med meritvami.

5.1.5 Uporaba večkanalne pipete

Uporaba večkanalne pipete močno olajša in pospeši delo. V našem eksperimentu je bila uporaba nujna, vsaj ko smo dodali fericianid. V primeru zmogljivejše aparature bi bilo možno dodati fericianid v različnih časovnih intervalih (npr. v intervalih meritev vzorcev), tako da bi kot rezultat dobili meritve vzorcev v enakih časovnih točkah.

Zanimivo je, da je standardna napaka najvišja, ko vse kemikalije razen fericianida dodamo z enokanalno pipeto in znaša v našem primeru 14,1 %. Močno se zmanjša, če z večkanalno pipeto dodamo že samo amonijev hidroksid in nato z enokanalno luminol in vzorec (na 6,6 % oz 7,1 %), in je najmanjša, ko dodamo vse kemikalije z večkanalno pipeto (3,9 oz. 4,9 %). Razlog večje standardne napake v primeru uporabe enokanalne pipete lahko najdemo v različno dolgem času priprave reakcijske mešanice. Kot smo dokazali, že sama priprava raztopine amonijevega hidroksida in luminola povzroči nižanje luminiscence v času od priprave raztopine. S pipetiranjem z enokanalno pipeto tako pripravimo reakcijske mešanice v različnih časih, kar vpliva na to, da so reakcijske mešanice različno »stare« in zato luminiscence bolj variabilne. Verjetno je variabilnost pogojena tudi z različnim raztapljanjem CO₂ v različno »starih« reakcijskih mešanicah (sprememba pH).

5.1.6 Dodatek encima askorbat oksidaze ekstraktu

5.1.6.1 Obstočnost encimske raztopine

Ob aktivaciji svežega encima smo preverili še morebitno razliko med sveže aktiviranim encimom in »starim« encimom aktiviranim pred sedmimi meseci. Encim je bil ves čas hranjen v hladilniku na 4°C. Encim aktiviran pred sedmimi meseci je imel pri prvi meritvi nižjo aktivnost kot sveže aktiviran, pri drugi meritvi pa je imel višjo aktivnost kot sveže pripravljene encim. To je nekako v nasprotju s priporočili Sige, saj priporočajo svežo pripravo pred uporabo le-tega. Spremenila se je tudi barva encimske raztopine iz brezbarvne v rdečo obarvano. V tistem času razloga za takšen rezultat nismo poznali, kot pa bo kasneje predstavljeno, je razlog najverjetneje v spremembi pH vrednosti celotne mešanice, ki zato daje višji signal, in verjetno ne v uporabi encima.

5.1.6.2 Vpliv pH in askorbat oksidaze na luminiscenco

Preglednica 3 prikazuje luminiscenco v reakcijsko mešanico odpipetiranega eluata s pH okoli 6 in pH 1 oz. eluata z encimom s pH vrednostjo okoli 6. Razlog, zakaj je luminiscenca eluata s pH vrednostjo 6 močno višja (za 79 %) od luminiscence eluata z askorbat oksidazo, ni popolnoma znan. Možnih razlag je več, katera ima večji vpliv, pa lahko le domnevamo. Prva možnost je, da z dodatkom encima razredčimo koncentracijo H_2O_2 in s tem zmanjšamo luminiscenco, čeprav gre za izredno majhno redčitev. Druga možnost je, da z dodatkom encima s pH vrednostjo 5,6 rahlo znižamo pH mešanico celotne reakcijske mešanice in tako znižamo luminiscenco. Tretja možnost je, da encim askorbat oksidaza absorbira luminiscenco in jo tako zniža. Četrta možnost pa je, da med encimom in ekstraktom potekajo reakcije, ki povzročijo izpostavitve bakrovih molekul in hitrejše uničenje molekul vodikovega peroksida. Morda pride tudi do rahle denaturacije encima v reakcijski mešanici, saj pH preseže 9.

Kot kažejo naši podatki, ima rahla sprememba pH vrednosti v celokupni reakcijski mešanici velik vpliv na luminiscenco. To je jasneje razvidno v primeru, ko eluat razdelimo na dva dela in enemu delu uravnamo pH na 9,5, drugemu pa na pH 6,13 (preglednica 4). Tu je razlika v luminiscenci več kot očitna.

5.1.7 Kemikalije in pH

Ker ima pH izreden pomen pri merjenju luminiscence, smo se odločili, da določimo pH vrednost ddH₂O (Slika 13). Ugotovili smo, da je pH vode izredno spremenljiv in da se z mešanjem izredno hitro spreminja. pH vode tako upade v manj kot 30 minutah s 7 na 6 ali manj. Razlog za to je v raztapljanju ogljikovega dioksida. CO₂ se v vodi raztaplja in z vodo kemijsko reagira tako, da dobimo ogljikovo kislino (H₂CO₃), ki potem v odvisnosti od pH vrednosti disociira v bikarbonatni ion (HCO₃⁻) in proton ter nato v karbonatni ion (CO₃²⁻).

Preglednica 5 prikazuje pH vrednosti posameznih kemikalij, celotne reakcijske mešanice brez vzorca in po dodatku vzorca (vode ali 5 % TCA). Opazimo lahko, da se pH celotne mešanice ob dodatku ddH₂O ni spremenil, pred in po dodatku je znašal 9,47. Kljub temu, da sam pH vode zaniha tudi pod 6. V primeru, ko dodamo k reakcijski mešanici 5 % TCA, pa vidimo znižanje pH z 9,47 pred dodatkom, na 9,32 po dodatku. To sicer ni veliko, vendar je razlika v luminiscenci glede na preglednico 3, kjer smo primerjali eluat s pH 6 in eluat s pH 1, več kot očitna. Postavlja se vprašanje, če gre dvig luminiscence izključno na

račun spremembe pH vrednosti. V desnem stolpcu je navedena tudi temperatura meritve, saj se pH spreminja s temperaturo.

Preverili smo tudi obstojnost kemikalij za pripravo reakcijske mešanice. Primerjavo smo izvedli za amonijev hidroksid med mesecem dni starim in sveže pripravljanim. Ugotovili smo, da je bila luminiscenca enake koncentracije standarda v primeru sveže pripravljene NH_4OH 5,4-krat višja od luminiscence 1 mesec starega NH_4OH . Pri merjenju pH vrednosti smo ugotovili, da se je 1 mesec staremu NH_4OH spremenil pH in je znašal samo 9,22, pri sveže pripravljenem pa 10,85, kar naj bi bil vzrok za razliko v luminiscenci. Zaradi omenjenega spoznanja smo v nadaljnjih meritvah pripravljali tedensko sveže kemikalije.

5.1.7.1 Primerjava umeritvene krivulje standarda pripravljene v NH_4OH in vodi

Razlog za nižjo luminiscenco nižjih koncentracij standarda bi lahko iskali v hitrosti reakcije, saj zaradi drugačne pH vrednosti reakcija poteka hitreje, torej se tudi reagenti hitreje porabijo. Ker merimo šele po določenem časovnem intervalu, je možno, da zaradi iztrošenosti reagentov merimo sredino oz. konec reakcije.

5.1.8 Uporaba različnih metod čiščenja ekstrakta

Iz preglednice 6 je razviden vpliv PVPP, ki smo ga kot 5% (w/v) dodali k ekstraktu pred centrifugiranjem. PVPP smo uporabili za odstranitev fenolnih substanc. Če čistimo rastlinski ekstrakt le s PVPP, opazimo majhno razliko med ekstrakti, kakor hitro pa supernatant nanese na DEAE je razlika močno opazna. Fenolne substance se očitno ne odstranijo z DEAE, vendar, kot je razvidno, dušijo luminiscenco. Prav tako lahko sklepamo, da imajo snovi, ki jih odstranimo z gelom DEAE, večje sposobnosti dušenja luminiscence od fenolnih spojin, kar opazimo s primerjavo luminiscence ekstrakta čiščenega samo s PVPP in ekstrakta čiščenega samo z DEAE. V primeru, ko predhodno čistimo s PVPP in nato še z DEAE, je luminiscenca za 68 % višja v primerjavi z vzorci, čiščenimi le z DEAE.

Če po čiščenju s PVPP uporabimo askorbat oksidazo za odstranitev askorbata, je v primeru uporabe PVPP signal luminiscence nižji kot v primeru, ko ne čistimo s PVPP. Opazno je, da je tokrat luminiscenca v primeru neuporabe PVPP višja, vendar pa je tak rezultat netočen, saj lahko fenoli v odsotnosti askorbata povzročijo spontan nastanek vodikovega peroksida.

Vidimo lahko tudi, da je zamenjava Dowex Ag 1x8 z DEAE uspešna, saj to potrjujejo podatki iz preglednice 6. Oba omenjena gela sta anionska izmenjevalca, pri čemer je Dowex Ag 1x8 močan, DEAE pa šibek anionski izmenjevalec. Uporabo gela Dowex smo zasledili v številnih člankih (Warm in Laties, 1982; Veljovic-Jovanovic in sod., 2002; Orozo-Cárdenas in Ryan, 2002; itd.), uporabe DEAE za odstranitev »obarvanih« produktov pa v literaturi nismo zasledili.

5.1.9 Optimizacija merjenja luminiscence

5.1.9.1 Vpliv stresanja in volumen fericianida

Izjemnega pomena so tako volumni kot koncentracije reagentov. Poleg omenjenega je izredno pomemben še čas in jakost stresanja.

Ugotovili smo, da lahko v primeru, ko vzorca ne premešamo, luminiscenca v določenem času po merjenju standarda celo narašča. Takšno dogajanje onemogoči primerjavo tudi med standardi, če en standard narašča, drugi pa upada. V takih primerih tudi ni mogoč izračun luminiscence v času 0 s, zato je ključno zagotoviti pogoje, da luminiscenca pada iz cikla v cikel.

Slika 14 prikazuje skoraj linearen odnos povečanja luminiscence ob povečanju volumna fericianida. Kot najoptimalnejši volumen med primerno jakostjo luminiscence in napako pipetiranja smo izbrali 10 μ l.

5.1.9.2 Določitev optimalnega števila vzorcev v okviru ene meritve

V našem primeru se je tekom eksperimentalnega dela kot najoptimalnejša izkazala hkratna analiza 4. vzorcev. Tako smo hkrati izmerili vzorce okuženih rastlin (Y), slepo inokulliranih (S) in intaktnih rastlin (K) ene časovne točke. Zadnji vzorec, standard oz. slepi vzorec (SV), pa nam je služil za pomoč v primeru odstopanj kemikalij ali drugih dejavnikov. Če bi merili vsak naš vzorec (Y, S, K) posebej, bi bila variabilnost in standardna napaka prevelika zaradi različnega časa merjenja. Če pa bi merili vse vzorce ene časovne točke naenkrat, bi bila časovna razlika med prvim merjenim in zadnjim merjenim vzorcem prevelika.

5.1.9.3 Določitev dejanskega časa merjenja

Preglednica 7 in 8 prikazujeta ključno pomanjkljivost aparature Tecan GENios za merjenje luminiscence. Pomanjkljivost ni, kot je bilo sprva mišljeno, v slabi občutljivosti senzorja, ampak v času premika senzorja. Nerazumljivo je nihanje dolžine ciklov znotraj meritve. Razlika v dolžini ciklov se spreminja od cikla do cikla in jo je nemogoče natančno napovedati za naslednji cikel.

Opazili smo, da niha tudi sam čas meritve vzorcev. Prva meritev cikla je daljša, in sicer za okoli 200 ms v primerjavi z ostalimi meritvami cikla. Postavlja se vprašanje, ali gre tu za dejansko meritev senzorja ali senzor samo miruje in ne meri. Najverjetneje senzor v tem času miruje in ne meri, saj bi bile verjetno ob upoštevanju upada luminiscence meritve tu za 6,7% višje, česar pa nismo opazili. Omenjeni čas je verjetno potreben za stabilizacijo senzorja.

Presenetljiva ugotovitev je bila, da je *čas pričetka meritve* verjetno temperaturno vezan in da je *čas pred meritvijo prvega* cikla lahko izjemno variabilen in zaniha od 3,8 s do 42,4 (PRILOGA A) in celo do 90 s. Ta izredno variabilni čas nam je pred tem spoznanjem povzročal veliko nejasnosti in neuporabnih informacij za primerjavo med meritvami.

Slika 15 prikazuje shemo meritve. Pred dodatkom fericianida smo pričeli s snemanjem zvoka. Hkrati z odpipetiranjem fericianida smo pričeli z odštevanjem časa 25 s. V tem času smo prenesli ploščico do aparature, nanjo postavili črno pokrovno ploščico in položili ploščico na prostor za vpoteg ploščice v aparaturo. Po preteku 25 s smo pritisnili gumb »START«. Iz slike se lepo vidi prvi pisk in nadaljnja piska ter vpoteg in stresanje ploščice.

Izmerjeni časi so vplivali tudi na sam potek meritve. Aparaturo smo nastavili v položaj za vpoteg ploščice. Na ta način smo prihranili 8 s, kolikor aparatura potrebuje, da izstavi ploščico in jo ponovno vpotegne. Celotni časi od prvega piska štoparice do pričetka meritve se nekoliko razlikujejo in v večini primerov znašajo $36,46 \pm 0,21$ s. Pri izračunu luminiscence smo upoštevali čas 35 s. Razlog je v tem, da ne moremo trditi, da smo vedno točno ob pisku štoparice pritisnili na gumb »START«. Prav tako nismo upoštevali napake daljše prve meritve ciklov. Sicer majhna razlika 200 ms prinese v 6-ih ciklih že napako v 1,2 s. Skratka ocenjena celokupna napaka je nekaj sekund, torej so tudi prikazani rezultati različni zaradi človeške napake za nekaj sekund.

Aritmetično sredino omenjenih časov smo uporabili za računanje oz. ekstrapolacije luminiscence na času 0 s. Poleg vseh omenjenih časov je najpomembnejši še čas premika

senzorja od ene luknjice do druge, ki znaša 0,46 s. Pri izračunu luminiscence za čas 0 s smo torej upoštevali 25 s za prenos ploščice, 35 s od klika na gumb »START« do dejanskega pričetka meritve in 0,46 s prehoda senzorja od ene luknjice na drugo.

5.1.10 Pregled in izbira metode obdelave podatkov

Računsko najhitrejša metoda je *metoda primerjave prve meritve prvega cikla vzorca s prvo meritvijo prvega cikla standarda*, vendar v našem primeru tudi manj zanesljiva. Pri tej vrsti obdelave podatkov preprosto vzamemo prvi podatek vzorca, ga delimo s prvim podatkom standarda ter kvocient pomnožimo z množinsko koncentracijo standarda oz. vrednost vzorca z odštetim slepim vzorcem iz umeritvene krivulje. Metoda ima več pomanjkljivosti, med katerimi je najpomembnejša neupoštevanje časa pričetka meritve. Iz preglednice 10 je razvidno, da je rezultat (srednja vrednost) glede na določeno vrednost H_2O_2 izmed štirih metod obravnavanih v tem poglavju pri tej metodi drugi najboljši.

Metoda primerjave vsote ciklov vzorca z vsoto ciklov standarda je enostavna in hitrejša od nadalje opisanih. Rezultati, ki jih daje so izpovprečeni in ne odražajo dejanskih meritev. Metoda prav tako ne upošteva razlike v časih od pričetka meritve, še več, metoda celo ne upošteva upada luminiscence v času in kot rezultat poda izpovprečeno vrednost. Tako se lahko dogodi, da kljub višji luminiscenci vzorca v prvem ciklu napram standardu določimo zaradi razlike v hitrosti upada luminiscence povprečno nižji signal vzorca od standarda, pri katerem luminiscenca upada počasneje. Iz preglednice 10 vidimo, da ta metoda daje tretji najboljši rezultat glede na določeno vrednost H_2O_2 .

Metoda primerjave ploščine vzorca s ploščino standarda je zahtevnejša, saj je potrebno izračunati integral med krivuljo in asimptoto, katero oklepa, zato je potrebno najprej narisati graf in izračunati krivuljo. Ta metoda je manj primerna za izračun in primerjavo ploščin vzorcev z močno različnim upadom luminiscence, primerna pa je, kadar želimo poudariti tako različne koncentracije vodikovega peroksida kot manjše razlike v upadu luminiscence. Kot že omenjeno je metoda neprimerna za izračun koncentracije vodikovega peroksida dveh v upadu luminiscence zelo različnih vzorcev, saj se v takem primeru ena krivulja npr. $Y_A = Y_{0A} + Ae^{-bx}$ običajno asimptotično približuje določeni vrednosti Y_{0A} , ki je za drug vzorec ($Y_B = Y_{0B} + Ae^{-bx}$) drugačna. Zaradi različnih vrednosti asimptot ($Y_{0A} \neq Y_{0B}$) nastane precejšnja napaka v ploščini med obema asimptotama.

Metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s je enostavnejša od metode primerjave ploščin, kljub temu pa je težavnejša od prvih dveh. To je verjetno najuporabnejša metoda za obdelavo podatkov vzorcev z različnimi upadi luminiscence, saj upošteva tako pozicijo posameznega vzorca na ploščici kot tudi ostale čase do dejanskega pričetka meritve.

Metoda ima dve pomanjkljivosti, saj ne omogoča ocene intervala zaupanja za izračunane podatke, prav tako pa je rekonstrukcija krivulje v primerih, ko se vrednosti luminiscence gibljejo med 0 in nekaj RLU, vprašljiva.

Komentar metod:

Izmed vseh uporabljenih metod izračunavanja lahko opazimo, da v večini metod podcenimo vrednost koncentracije H_2O_2 v rastlinskem materialu. Praktično nam nobena izmed prvih treh metod ne omogoči dejanske določitve koncentracije H_2O_2 , saj se v vseh primerih gibljemo pod vrednostjo slepega vzorca. Le metoda ekstrapolacije podatkov na čas 0 s omogoči dokaz višje luminiscence od slepega vzorca in določitev koncentracije H_2O_2 v rastlinskem materialu. V preglednici 10 opazimo, da z zadnjo opisano metodo dobimo najvišji rezultat, ki se od rezultatov dobljenih z ostalimi metodami močno razlikuje (tudi za več kot 3-krat). Izbira metode obdelave podatkov je ključnega pomena, saj lahko z napačno izbiro napravimo več kot 3-kratno napako, kar smo tudi pokazali. Seveda je pomembno tudi, na kakšno vprašanje naj nam metoda odgovori. Tako je metoda 2 primerna, kadar so razlike v luminiscenci zelo velike in nas samo zanima dokaz razlike npr. luminiscenca samega ekstrakta in eluata, vendar pa določitev koncentracije H_2O_2 v vzorcu ne omogoča.

5.1.11 Meritev koncentracije vodikovega peroksida v rastlinskem materialu

5.1.11.1 Izkoristek

Opazili smo, da je luminiscenca H_2O_2 po nanosu na kolono in eluciji višja od pričakovane oz. višja od standarda, ki naj bi predstavljal končno molarnost na kolono nanešenega in eluiranega H_2O_2 . S pripravo umeritvene krivulje v 5 % TCA nevtralizirani s K_2CO_3 smo pokazali, da je možen razlog v 2-krat višji luminiscenci najverjetneje v vodi, saj je luminiscenca standarda v 5 % TCA nevtralizirani s K_2CO_3 na pH 6,46 (preglednica 11) bolj primerljiva z luminiscenco na kolono nanešenega in eluiranega H_2O_2 . Izjemnega pomena je torej izbira pravilne umeritvene krivulje, saj je izkoristek lahko ob nepravilni izbiri le-te napačno ocenjen na kar 426 %. Pravilnejši izkoristek (107,1 %) dobimo, če upoštevamo dve meritvi na kolono nanešenega H_2O_2 , od katerega odštejemo slepi vzorec, in luminiscenco odčitamo iz umeritvene krivulje standarda, pripravljene v istem dnevu v 5 % TCA nevtralizirani s K_2CO_3 .

5.1.11.2 Časovni pregled upada luminiscence slepega vzorca

Tekom testiranja rastlinskega materiala smo opazili, da se je luminiscenca slepega vzorca spreminjala. Pri ugotavljanju možnega vzroka smo preizkusili več hipotez, vendar celovitega odgovora nismo našli. Slika 17 prikazuje povprečno dnevno luminiscenco slepega vzorca od 29.11 - 21.12.2006. Na grafu opazimo črtkano krivuljo, ki povezuje srednjo vrednost dnevne meritve slepega vzorca. Opazimo, da luminiscenca slepega vzorca ves čas bolj ali manj upada. Prvi možni razlog za tak upad bi bil zamenjava kemikalij in npr. napaka, ki nastane zaradi rahlo različnega zatehtavanja. Dneve menjav / priprav kemikalij prikazujejo pokončne rdeče črte. Vidimo lahko, da priprava kemikalij ne pojasni upada. Če bi bil upad vezan na starost kemikalij v tem kratkem intervalu, potem bi se vrednost slepega vzorca po pripravi povrnila na prejšnje stanje, a se ne. Druga možnost bi bila sprememba vode in s tem posledični vpliv na luminiscenco. Za čiščenje vode se uporablja dvojni sistem. Voda se najprej prefiltrira skozi filtre za mehanske delce, nato se ji doda 99,8 % NaCl. Sledi reverzna osmoza, pri čemer se voda razdeli na dva dela. Prvi del potuje naprej na sistem Milli RO 6 PLUS, ki se uporablja za analize vzorcev. Ker je voda po navedenem čiščenju izjemno čista, obstaja le malo verjetnosti, da bi bila za upad luminiscence kriva voda, čeprav se vsaj v nekaterih fazah diagrama zdi, kot da bi se iz sistema izpiralo nekaj, kar bi jačalo luminiscenco. Težko je navesti razlog nihanja naših meritev, saj obstaja tudi možnost nečistoč na steklovini, voda namenjena za splakovanje steklovine namreč ni čiščena preko Milli RO 6 PLUS. Morebitne nečistoče (npr. kovine) prisotne na steklovini, bi morda utegnile motiti naše meritve, saj se luminiscenčne metode uporabljajo tudi za ugotavljanje koncentracij kovin v vodi.

5.1.11.3 Vodikov peroksid v rastlinah

Iz grafa slike 18, ki prikazuje na čas 0 s preračunano luminiscenco rastlinskega materiala, težko karkoli sklepamo, zato je potrebno podatke predstaviti na tak način, da bodo razlike opaznejše in vidne, kar pa prikazujeta sliki 19 in 20. Obe sliki predstavita enake podatke, vendar lahko opazimo razlike med grafoma. Večje razlike opazimo pri simptomih, kjer se na sliki 19 luminiscenca okuženih rastlin (Y) giblje rahlo nad luminiscenco kontrolnih rastlin, na sliki 20 pa se razmerje luminiscenc giblje pod razmerjem kontrolnih rastlin. Pravilnejši je verjetno graf na sliki 20, saj primerja daljši čas luminiscence kot graf z odštetimi vrednostmi na sliki 19, kjer primerjamo le razliko v primerjavi dveh točk. Primerjava ploščin se uporablja tudi za ugotavljanje upada luminiscence (Georgetti in sod., 2003).

S primerjanjem ploščin rastlinskega materiala s približno enakim upadom luminiscence primerjamo tako količino H_2O_2 kot sam upad le-tega. Zavedati se je potrebno dejstva, da, kadar imata vzorca enako količino H_2O_2 in se razlikujeta le v upadu, bo ploščina višja pri vzorcu s počasnejšim upadanjem, kadar pa imata vzorca enak upad in različni koncentraciji H_2O_2 , pa bo ploščina višja pri vzorcu z višjo koncentracijo vodikovega peroksida. Tako pridobimo nekako celovit vpogled v dogajanje tekom okužbe pri rastlini.

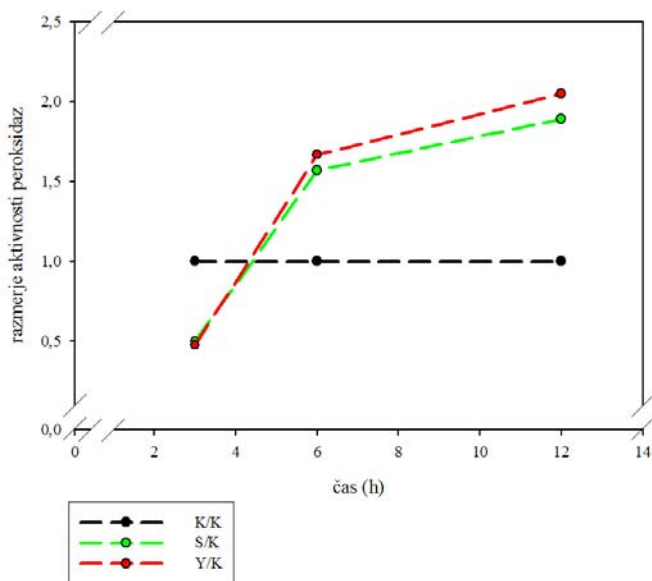
Nadaljnja razlaga temelji na sliki 20. Iz grafa opazimo velike standardne napake, zato je primerneje govoriti o trendih, kot samih rezultatih. Na sliki 20 je podana vrednost kot razmerje ploščin luminiscenc Y/K med okuženimi (Y) in intaktnimi (K) oz. razmerje S/K med slepo inokuliranimi (S) in kontrolnimi rastlinami (K). Pri nadaljnji razlagi bomo uporabljali izraz vrednost razmerja luminiscenc, ki v primeru slepo inokuliranega materiala (S) predstavlja razmerje ploščin luminiscenc S/K, v primeru okuženega materiala (Y), razmerje Y/K, in v primeru intaktnega (K) materiala razmerje K/K.

Pol ure po inokulaciji je vrednost razmerja luminiscenc slepo inokuliranega (S) kot vrednost luminiscenc okuženega (Y) vzorca pod vrednostjo vzorca intaktnih rastlin (K). To je v nasprotju z našimi pričakovanji, saj smo pri S in Y pričakovali višje vrednosti. Rezultat je lahko posledica izpiranja listov po 10 minutni mehanski inokulaciji rastlin, pri čemer smo morda sprali tudi H_2O_2 . Lahko pa je rezultat preprosto posledica dejstva, da smo že zamudili prvi vrh ROS, saj, kot kažejo podatki v literaturi, se lahko prvi vrh konča že po 15 minutah po okužbi (povzeto po Baker in Orlandi, 1999). Zaradi velikih standardnih napak je nesmiselno govoriti o kakršnih koli razlikah med S, Y in K.

V času ene ure po inokulaciji opazimo porast tako vrednosti razmerja luminiscenc slepo inokuliranih (S) kot okuženih rastlin (Y). Opazno je, da je vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin (Y) višja od vrednosti neokuženih (S), obe pa sta višji od kontrole (K). V literaturi zasledimo, da rastline, ki jih napade herbivor, v primerjavi z ranjenimi povišajo koncentracijo H_2O_2 (Maffei in sod., 2006). Eno uro po napadu herbivora se zniža aktivnost askorbat peroksidaze (APX), peroksidaz (PX), glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GPX), poviša pa se aktivnost katalaze (CAT). Aktivnost superoksid dimutaze (SOD) ostane nespremenjena. Prav tako ugotavljajo, da naj bi pri biotskem stresu prišlo do znižanja aktivnosti APX in CAT ter posledično PCD, v primeru abiotskega stresa pa naj bi prišlo ravno do obratnega procesa, torej aktivacije mehanizma za odstranjevanje ROS (povzeto po Mittler, 2002). Morda se nekaj podobnega dogodi tudi pri okuženem krompirju 'Igor', če vzamemo primerjavo z napadom herbivora, kjer se aktivnost SOD ne spremeni, torej se tudi hitrost nastajanja H_2O_2 ne spremeni, spremeni pa se aktivnost encimov, ki sodelujejo pri odstranjevanju ROS, in sicer se pospeši odstranjevanje ROS pri mehanski poškodbi, pri napadu herbivora pa se odstranjevanje zmanjša. Torej bi lahko

sklepali, da količina vodikovega peroksida ni omejena z njegovim nastankom, ampak je količina v času 1 h po inokulaciji omejena z razgradnjo, ki je višja pri mehanski poškodbi kot pri napadu herbivora. Enako opazimo tudi pri primerjavi okuženega (Y) in slepo inokuliranega (S) vzorca, saj je vrednost razmerja luminiscenc okuženega materiala (Y) najvišja, najnižje pa je vrednost intaktnega materiala (K).

Tri ure po inokulaciji opazimo nekakšen prehod in sekanje krivulj slepo inokuliranega (S) in okuženega vzorca (Y). Opazno je, da vrednost razmerja luminiscenc okuženega vzorca (Y) upade pod vrednost slepo inokuliranega (S). Glede na literaturo je možno sklepati, da imajo peroksidaze za odstranjevanje H_2O_2 pomembno vlogo. Ugotovili so namreč, da celice z intaktnimi celičnimi stenami v primerjavi s protoplasti izredno hitro odstranjujejo H_2O_2 . Če sedaj primerjamo naše podatke s podatki o aktivnosti peroksidaz prikazanih v doktoratu Milavčeve (2004), ugotovimo obratno sorazmerje med aktivnostjo peroksidaz in koncentracijo H_2O_2 . Podatki Milavčeve so predstavljeni kot razmerje celokupne aktivnosti peroksidaz med slepo inokuliranimi (S) in kontrolnimi (K) S/K ali okuženimi (Y) in kontrolnimi (K) rastlinami Y/K.



Slika 21: Pregled razmerja aktivnosti peroksidaz v časovnem poteku okužbe (podatki Milavec, 2004 str. 62, 64 in 67)

Iz slike 21 je razvidno sledeče: pri 3 h je aktivnost peroksidaz slepo inokuliranih (S) in okuženih (Y) rastlin nižja od aktivnosti kontrolnih rastlin (K). Torej bi morala biti v našem primeru luminiscenca pri S in Y višja od luminiscence kontrole, v primeru da so peroksidaze edini encimi, ki razgrajujejo H_2O_2 . Vendar, kot lahko opazimo, je luminiscenca rahlo nižja od kontrole. Verjetno gre ta razlika na račun CAT, za katere so Maffei s sod. (2006) opazili, da je bila njihova aktivnost v primerjavi z mehansko

poškodovanimi listi v prvi uri po napadu herbivora povišana. Tako na grafu razmerij luminiscenc (Slika 20) kot na grafu razmerij aktivnosti peroksidaz (Slika 21) lahko opazimo, da sta krivulji slepo inokuliranih (S) in okuženih rastlin (Y) izjemno blizu skupaj. Pri pregledu podatkov za časovno točko 6 h ugotovimo, da se krivulja razmerja luminiscence slepo inokuliranih rastlin (S) giblje nad okuženimi (Y), obe pa močno pod krivuljo intaktnih rastlin (K) (Slika 20).

Iz podatkov prikazanih na sliki 21 lahko razberemo, da je krivulja razmerja aktivnosti peroksidaz okuženih rastlin (Y) 6 h po inokulaciji višja od slepo inokuliranih rastlin (S), obe krivulji (Y) in (S) pa se gibljeta močno nad krivuljo intaktnih rastlin (K).

Tudi Maffei in sod. (2006) ugotavljajo, da se spremeni aktivnost encimov v času od 1 h do 6 h po poškodbi tako pri mehansko ranjenih rastlinah kot pri rastlinah po napadu herbivora. Encimska aktivnost APX, PX in GR je 1 h po napadu herbivora primerjalno nižja od mehansko poškodovanih listov, v času 6 h pa je višja.

Pri simptomih opazimo, da je vrednost razmerja luminiscenc v primeru slepo inokuliranih (S) rastlin najvišje, sledi vrednost razmerja luminiscenc kontrolnih rastlin (K), pod kontrolnimi pa je vrednost razmerja luminiscenc okuženih (Y) rastlin. Semprimožnik (1999) ugotavlja, da je bila aktivnost peroksidaz 24 h po inokulaciji v inokuliranih listih okuženih rastlin bistveno višja kot v intaktnih in slepo inokuliranih rastlinah. Prav tako je bila povišana aktivnost topnih in ionsko vezanih peroksidaz pri listih s primarnimi bolezenskimi znaki. Podobni trend se pokaže tudi pri luminiscenci na sliki 20.

V preglednici 12 so prikazane izmerjene vrednosti luminiscence, v preglednici 13 pa podatki iz preglednice 12 preračunani na čas 0 s. Opazimo lahko, da v preglednici 12 v nobenem izmed vzorcev v rastlinskem materialu luminiscenca ne preseže luminiscence slepega vzorca, zato brez uporabe metode ekstrapolacije luminiscence na čas 0 s ni možna določitev H_2O_2 v rastlinskem materialu. Pokazali smo tudi, da se je vrednost slepega vzorca tekom eksperimentalnega dela spreminjala, zato je nujno, da samih vrednosti luminiscenc različnih vzorcev ne primerjamo med seboj. Tako, kot se je luminiscenca slepega vzorca spreminjala in upadla z več kot 400 RLU na približno 100 RLU, se je verjetno spreminjala tudi luminiscenca rastlinskega materiala. Nujno je torej primerjati rastlinski material z ustrežajočo umeritveno krivuljo. Ugotovili smo, da ob pravilni primerjavi srednje vrednosti koncentracij H_2O_2 bistveno ne variirajo in se gibljejo v rangi med 4,11 do 5,20 μM .

Vprašanje je tudi, kako najbolj optimalno izračunati koncentracijo H_2O_2 v rastlinah. V našem primeru smo najprej izračunali povprečno umeritveno krivuljo (običajno 3 meritev

standarda), od katere smo odšteli srednjo vrednost slepega vzorca, te rezultate pa uporabili za izračun logaritma umeritvene krivulje. Nato smo od posameznega vzorca odšteli vrednost slepega vzorca in logaritemsko razliko razbrali iz umeritvene krivulje. Tako nam je uspelo določiti koncentracijo H_2O_2 npr. v primeru 0,5 h, kjer je bila ena meritev nad slepim vzorcem, druga pa pod in povprečje obeh meritev ne preseže povprečnega slepega vzorca, ena izmed obeh meritev ga pa.

V naših primerih smo določili koncentracijo H_2O_2 v intaktnih listih (K) $131,9 \pm 83,5$ nmol/g sveže mase rastlinskega materiala. V nekaterih primerih nismo določili H_2O_2 . Najverjetnejši razlog je v pomanjkljivostih aparature in z njimi pogojenimi težavami.

V člankih je moč zaslediti različne koncentracije H_2O_2 . Neill in sod. (2002a) so ugotovili, da so tako variabilne koncentracije (med 60 μ M in 7mM pri *Arabidopsis* in 1-2 mM pri koruzi in rižu) verjetno odraz tehničnih težav določanja H_2O_2 .

Veljovic-Jovanovic in sod. (2002) tako predstavijo možne pomanjkljivosti metod in izmerijo koncentracijo H_2O_2 v listih *Arabidopsis thaliana* med 40 - 120 nmol/g sveže mase. Okuda in sod. (1991) določijo koncentracijo H_2O_2 v intaktnih listih pšenice med 0,6 - 0,8 μ mol/g sveže mase pri T 28°C in na svetlobi, pri rastlinah v temi pa med 0,1 - 0,3 μ mol/g svežega materiala. Malolepsza (2005) ugotovi, da pretretiranje rastlinskih tkiv paradižnika z o-hidroksietilorutin-om in nadaljnja inokulacija z *Botrytis cinerea* izzove produkcijo 500 nmol H_2O_2 /g sveže teže, kar je dvakratna koncentracija kot v intaktnih rastlinah. Vendar o-hidroksibutilorutin-in že sam izove proizvodnjo ROS. Glede na podatke v literaturi in naše eksperimentalno delo lahko ugotovimo, da so eksperimentalno dobljeni podatki v rangu koncentracij vodikovega peroksida drugih rastlin, ter da smo relativno uspešno, kljub številnim pomanjkljivostim, vpeljali metodo določanja vodikovega peroksida za analizo s čitalcem mikrotiterskih ploščic.

5.2 SKLEPI

- Če želimo uporabiti čitalec mikrotiterskih ploščic za analizo vzorcev s hitrim upadom luminiscence, kakršen je tudi rastlinski material, in hkrati analizirati večje število vzorcev, je nujno uporabiti čitalec z injektorji.
- Na luminiscenco vplivajo številni dejavniki, najvišji vpliv pa imajo pH, koncentracije reagentov, čas meritve in tretiranje vzorca.
- Rastlinski material ima hitrejši upad luminiscence od standarda. Luminiscenca višjih koncentracij standarda upada hitreje od nižjih.
- Raztapljanje CO₂ v vzorcu vpliva na pH vrednost in posledično na rezultat meritve. Zato je potrebno pripravljati sveže kemikalije, uporaba večkanalne pipete pa zniža standardno napako.
- Bazalne koncentracije vodikovega peroksida v rastlinah nihajo, vendar pri listih intaktnih rastlin ne presežejo 146 nmol/g sveže mase.
- Končne rezultate testiranja rastlinskega materiala smo predstavili kot razmerje ploščin luminiscenc. Z izrazom vrednost razmerja luminiscenc smo v primeru slepo inokuliranega materiala (S) označili razmerje ploščin luminiscenc S/K, v primeru okuženega materiala (Y), razmerje Y/K, in v primeru intaktnega (K) materiala razmerje K/K. Ugotovili smo, da je najvišja vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin občutljive sorte 'Igor' 1 h po inokulaciji. Tri ure po inokulaciji je vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin podobna razmerju slepo inokuliranih, v obeh primerih pa nižja od intaktnih rastlin. Šest ur po inokulaciji je vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin nižja od razmerja slepo inokuliranih rastlin, obe vrednosti razmerij luminiscenc pa sta pod razmerjem intaktnih rastlin. V času pojava simptomov je vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin pod intaktnimi, razmerje slepo inokuliranih pa nad kontrolnimi rastlinami.

6 POVZETEK

Luminiscenčne metode so zaradi nizke cene in visoke občutljivosti primerne za uporabo v številnih znanstvenih disciplinah in panogah. Metodo zaznavanja vodikovega peroksida v kivetah sta že leta 1982 predstavila Warm in Laties, kljub temu pa metode testiranja rastlinskega materiala z uporabo čitalca mikrotiterskih ploščic razen redkih izjem (Razinger in sod., 2006) v literaturi nismo zasledili.

Naše delo je potekalo v dveh delih. V prvem delu smo prilagodili metodo detekcije H_2O_2 za uporabo čitalca mikrotiterskih ploščic, v drugem delu pa smo modificirano metodo uporabili za analizo H_2O_2 v spodnjih listih rastlin krompirja sorte 'Igor'. Skušali smo ugotoviti, kako okužba in slepa inokulacija vplivata na sproščanje H_2O_2 . Rastlinski material razdeljen na intaktno, slepo inokulirano in okuženo skupino smo pobrali v 5-ih časovnih točkah po inokulaciji oz. v ustrezajočih časih v primeru intaktnih rastlin.

Ugotovili smo, da na rezultat meritve vplivajo številni dejavniki. Med pomembnejšimi med seboj povezanimi dejavniki so temperatura, pH, koncentracije reagentov, starost kemikalij in drugi. Ugotovili smo, da preko razredčitve tudi volumen ekstrakcijskega reagenta in volumen elucije vplivata na končno koncentracijo prisotnih dušilcev luminiscence v analiziranem materialu. Pokazali smo, da z redčenjem rastlinskega materiala prihaja do hitrejšega nižanja koncentracije H_2O_2 kot zaradi razredčitve dušilcev, saj je luminiscenca 10-krat bolj redčenega vzorca le 4-krat višja kljub enaki končni koncentraciji H_2O_2 . Ugotovili smo tudi, da luminiscenca eksponencialno upada in da je upad odvisen od vrste analiziranega vzorca. Luminiscenca rastlinskega materiala upada hitreje kot luminiscenca standarda, pri višjih koncentracijah standarda pa hitreje kot pri nižjih. Razlike v upadu luminiscence so celo med različno čistimi vzorci. Zaradi eksponencialnega upada luminiscence je ključen tudi čas meritve po dodatku fericianida, zato kljub možni hkratni analizi 96 vzorcev takšna analiza ni smotna. Pokazali smo, da je čas pričetka meritve čitalca mikrotiterskih ploščic Tecan GENios najverjetneje temperaturno pogojen in da pričetek meritve lahko variira od nekaj sekund tudi do 1,5 min. Zaradi omenjenih težav smo razvili metodo, ki omogoča primerljivost podatkov tako med različnimi vzorci znotraj meritve kot med različnimi meritvami. Omenjena metoda temelji na izračunavanju vrednosti luminiscence v času 0 s.

Za odstranitev askorbata, dušilca luminiscence, smo v prvem delu uporabljali encim askorbat oksidazo, kasneje pa smo ugotovili, da gre verjetneje razliko v luminiscenci pripisati spremembi pH vrednosti in verjetno ne odstranitvi askorbata.

V drugem delu smo uporabili naše izsledke za analizo rastlinskega materiala. Rastlinski material smo ekstrahirali, mu dodali 5% (w/v) PVPP in centrifugirali. Supernatant smo nanесли na kolono in eluirali s 3,5 ml, eluatu pH uravnali na 6,4 – 6,5, centrifugirali in nato pomerili luminiscenco. Hkrati smo analizirali vedno le eno paralelko časovne točke in za analizo uporabili večkanalno pipeto. Tekom eksperimentalnega dela smo opazili upad dnevnih srednjih vrednosti slepega vzorca, zato smo končne rezultate predstavili z razmerji ploščin luminiscenc. Z izrazom vrednost razmerja luminiscenc smo v primeru slepo inokuliranega materiala (S), označili razmerje ploščin luminiscenc S/K, v primeru okuženega materiala (Y), razmerje Y/K, in v primeru intaktnega (K) materiala razmerje K/K.

V času 0,5 h zaradi velikih standardnih napak ne moremo govoriti o razlikah med slepo inokuliranimi, intaktnimi in okuženimi rastlinami.

Eno uro po inokulaciji je vrednost razmerja luminiscenc slepo inokuliranih (S) rastlin večje od vrednosti razmerja luminiscenc intaktnih (K) rastlin, vrednost razmerja luminiscenc okuženih pa celo večja od vrednosti razmerja luminiscenc okuženih rastlin (Y). Razlog višjega razmerja pri okuženih rastlinah gre verjetno na račun znižanja aktivnosti peroksidaz, askorbat peroksidaze in glutation reduktaze.

Tri ure po inokulaciji opazimo nekakšen prehod in sekanje krivulj vrednosti razmerij luminiscenc slepo inokuliranega (S) in okuženega vzorca (Y), 6 h po inokulaciji pa najnižjo vrednost razmerja luminiscenc pri okuženih rastlinah. Takšen prehod je možno razložiti s spremembo aktivnosti peroksidaz, saj se razmerje aktivnosti spremeni in je 6 h po inokulaciji pri okuženih rastlinah najvišje, razmerje luminiscenc pa najnižje.

Pri simptomih je vrednost razmerja luminiscenc okuženih rastlin najnižja, celo pod kontolo, najvišja nad kontrolo pa je vrednost razmerja luminiscenc slepo inokuliranih rastlin. Tudi pri simptomih se podatki ujamejo s podatki o aktivnosti peroksidaz (Milavec, 2004).

Koncentracija H_2O_2 v intaktnih listih (K) doseže do 146 nmol/g sveže mase rastlinskega materiala. Tako določena koncentracija H_2O_2 v intaktnih listih je podobna koncentracijam H_2O_2 izmerjenih v listih drugih rastlin, kar kljub številnim težavam kaže na uspešno uvedbo metode.

7 VIRI

- Afri M., Frimer A.A., Cohen Y. 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part 4 : Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DHCH-DA) in the lipid bilayer. *Chemistry and Physics of Lipids*, 131: 123-133
- Baker C. J., Orlandi E.W. 1999. Active oxygen and pathogenesis in plants. APS PRESS *Plant-Microbe Interactions*, 6: 81-119
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T.P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica*, 1758 : 994-1003
- Dilbeck L. 2006. Use of bluestar forensic in lieu of luminol at crime scenes. *Journal of Forensic Identification*, 56, 5: 706 – 720
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241-254
- Gara L., de Pinto M. C., Tommasi F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 863-870
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro M. V., Azzolini A.E., Fonseca M.J.V. 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by chemiluminescence method. *AAPS PharmSci*, 5, 2: 1-5
- Grofelnik G. 2005. Vpliv luminola na izolacijo DNK iz krvnih madežov. *Diplomska naloga*, Univerza v Mariboru, Fakulteta za policijsko varnostne vede: 54 str.
- Heywood H., V., Moore D.M., Richardson I.B.K., Stearn W. T. 1995. *Cvetnice : Kritosemenke sveta*. Ljubljana. DZS. 229 str.
- Kač M. 2004. *Kemija*. Tržič. Učila international: 221, 315, 361, 362, 368 str.
- Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 6, 30: 620-650
- Krasowska A., Rosiak D, Szkapiak K., Łukaszewicz. 2000. Chemiluminescence detection of peroxyl radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. *Current Topics in Biophysics*, 24, 92, 0: 89-95

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

Kus M. 1994 . Krompir. Ljubljana. Kmečki glas. 107-117 str.

Lepan Narič S. 1997. Priprava vzorcev za določanje endogene JA iz rastlin po inokulaciji s PVY^{NTNSLO}. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 53 str.

Li Z., Burritt D.J. 2003. The influence of *Cocksfoot mottle virus* on antioxidant metabolism in the leaves of *Dactylis glomerata* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 285-295

Lin J. N., Kao C.H. 1998. Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39: 161 – 165

Lopez-Delgado H., Dat F. J., Foyer C.H., Scott I. M. 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetilsalicylic acid and H₂O₂. *Jurnal of Experimental Botany*, 321, 49 : 713-720

Lu H., Higgins V.J. 1998. Measurement of active oxygen species generated in planta in response to elicitor AVR 9 of *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52: 35-51

Maffei M.E., Mithöfer A., Arimura G. I., Uchtenhagen H., Bossi S., Berteza C.M., Cucuzza L. S., Novero M., Volpe V., Quadro S., Boland W. 2006. Effect of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide. *Plant physiology*, 140: 1022-1035

Malolepsza U., 2005. Spatial and temporal variation of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in o-hydroxyethylrutin-treated tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, 54: 317-324.

Miki T., Oshima N. 1972. On the size of the protein subunits in potato virus Y. *J. Gen. Virol.*, 15: 179-182

Milavec M. 2004. Peroksidaze in jasmonska kislina v različnih sortah krompirja (*Solanum tuberosum* L.) po okužbi s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 148 str.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 9, 7: 405-410

Moliner-Martinez Y., Meseguer-Lloret S., Tortajada-Genaro L.A., Campins-Falcó P. 2003. Influence of water sample storage protocols in chemiluminescence detection of trace elements. *Talanta*, 60: 257-268

Naves M. J., Jiménez. 1995. Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chemistry*, 55: 7-15

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

Neill S., Desikan R., Hancock J. 2002a Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 388-395

Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. 2002b. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 372, 53: 1237-1247

Neves C., Cláudia M. S., Amânico S. 1998. Histochemical detection of H₂O₂ by tissue printing as precocious marker of rhizogenesis in grapevine. *Plant Physiol. Biochem.*, 11, 36: 817-824

Okuda T., Matsuda Y., Yamanaka A., Sagisaka S. 1991. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.*, 97: 1265-1267

Orozo-Cárdenas M. L., Ryan A. C. 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiology*, 130: 487-493

Ortega-Villasante C., Rellán-Álvarez R., Del Campo F. F., Carpena-Ruiz R. O., Hernández E. L. 2005. Cellulal damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 418, 56: 2239-2251

Pérez J.F., Rubio S. 2006. An improved chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in plant tissues. *Plant Growth Regulation*, 48: 89-95

Petauer T. 1993 . Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije. 541, 542, 543 str.

Pignocchi C., Foyer C.H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 379-389

Praprotnik N., 2002. Rastline. Tržič. Učila international. 263 str.

Radwan D.E.M., Fayez K.A., Mahmoud S.Y., Hamed A., Lu G. 2006. Salicylic acid alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zucchini yellow mosaic virus infection in *Cucurbita pepo* leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 172-181

Rao M.V., Lee H., Creelman R. A., Mullet J. E., Davis R. K. 2000. Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *The Plant Cell*, 12: 1633-1646

Razinger J., Drinovec L., Zrimec A. 2007. Real-time in vivo visualisation of oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.). *Central European Journal of Biology*, 2, 3: 351-363

Šuštaršič M. Uvedba luminiscenčne metode za merjenje vodikovega peroksida v zdravih in okuženih listih krompirja (*Solanum tuberosum* L.)
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo, 2008

- Razinger J., Dermastia M., Dolenc-Koce J., Zrimec A. 2006. Biochemical and chemiluminescents markers of cadmium induced oxidative stress in duchweed (*Lemna minor* L.) Knjiga povzetkov / 4. slovenski simpozij o rastlinski biologiji z mednarodno udeležbo, Ljubljana, 12.-15. september 2006 4th Slovenian Symposium on Plant Biology with International Participation, Ljubljana, September 12-15, 2006. - Ljubljana : Društvo za rastlinsko fiziologijo Slovenije/ The Slovenian Society of Plant. str. 191 - 192.
- Riedle-Bauer M. 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Phytopathology*, 148 : 297-302
- Semprimožnik M. 1999. Fotosintetski pigmenti in peroksidaze po okužbi krompirja (*Solanum tuberosum* L.) sorte 'Igor' s krompirjevim virusom Y^{NTN}. Magistersko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 100 str.
- Sluga T. 1994 . Krompirjeve sorte za pridelavo v Sloveniji. Ljubljana. ČZP Kmečki glas : 6-11, 25 str.
- Tarpey M. M., Wink D.A., Grisham M.B. 2004. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286 : R431-R444
- Tarpey M. M. in Fridovich I. 2001. Methods of detection of vascular reactive species. Nitric oxide, superokside, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Circulation Research*, 89: 224-236
- Veljovic-Jovanovic S., Noctor G., Foyer H. F. 2002. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 501-507
- Walrand S., Valeix S., Rodriguez C., Ligot P., Chassagne J., Vasson M. P. 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of tree fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta*, 332: 103-110.
- Warm E. in Laties G.G. 1982 . Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry*, 4, 21: 827-831
- Yifeng T., Yingying Q., Ying W., Junwei D. 2003 . Quenching electrochemiluminescent analysis of pico-molar level glutathione. *CJI*, 12, 5: 1-5

ZAHVALA

Diplomsko delo posvečam pokojnemu očetu, ki me je navdušil za biologijo in me vedno podpiral v mojih odločitvah.

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr Maji Kovač, za številne ure diskusij, za vso pomoč, tako tekom eksperimentalnega dela, kot pri izdelavi pisnega izdelka, predvsem pa za optimizem in spodbudne besede. Za pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge, pregled izračunov in diplomskega dela se najlepše zahvaljujem somentorju dr. Alexisu Zrimcu.

Za pomoč pri raziskovanju aparature Tecan se zahvaljujem dr. Bojani Žegura. Zahvaljujem se g. Jaku Razingerju za številne koristne nasvete in pomoč pri merjenju luminiscence. Dr. Drinovcu, pa se zahvaljujem za pomoč pri računskih težavah.

Dr. Mojci Milavec se zahvaljujem, za pomoč pri pobiranju rastlinskega materiala, za koristne nasvete pri zatehtavanju rastlinskega materiala in tudi sicer vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.

Gospe Lidiji Matičič se iskreno zahvaljujem za vso pomoč pri izvedbi diplomskega dela, številne koristne nasvete, pomoč ob kritičnih trenutkih, ... kaj naj še napišem? Lidija HVALA! Prav tako se zahvaljujem gospe Mariji Slovnik Udovič, ki je vedno skrbela, da so bile moje zaloge tipsov polne in mi pomagala iz marsikatere zagate.

Za vse informacije o sistemu čiščenja vode se zahvaljujem g. Alešu Blatniku.

G. Tomažu Rijavcu se zahvaljujem za zanimive pogovore, ter pomoč pri ugotavljanju vzrokov začetnih neponovljivosti meritev.

Za izjemno hiter pregled diplomske naloge, koristne nasvete in popravke se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Marjani Regvar in prof.dr. Marini Dermastia.

Najlepša hvala vsem, iz oddelka za rastlinsko fiziologijo in biotehnologijo Nacionalnega inštituta za biologijo, ki so mi pomagali pri kakršnikoli zagati.

Gospodu Alešu Pircu se zahvaljujem za slovnični pregled diplomske naloge.

Mami se zahvaljujem, ker je ves ta čas verjela vame, me podpirala in razumela. HVALA!

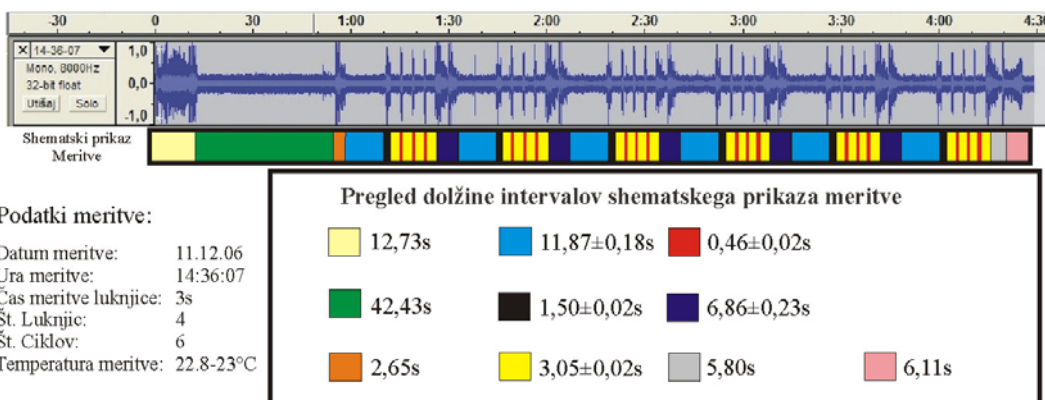
Hvala vsem prijateljem in znancem, ki so verjeli vame in mi vlivali optimizem, še posebno gospe Doris Pavlin.

PRILOGA A

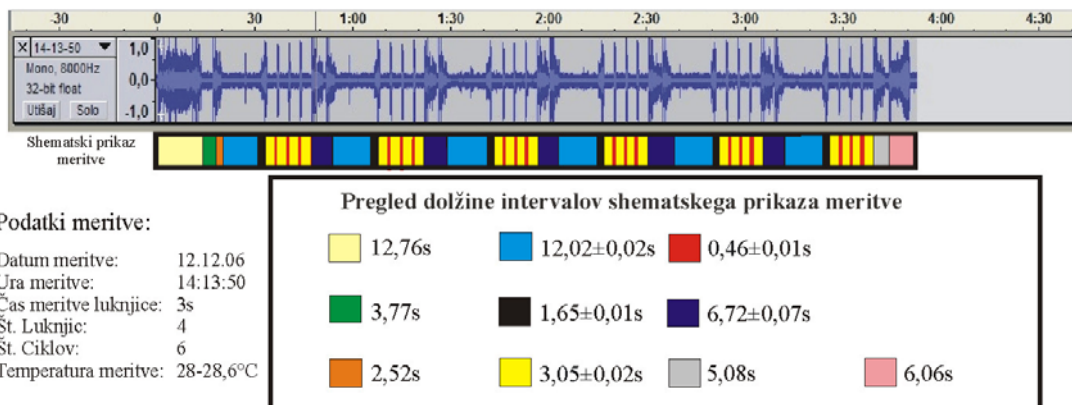
VPLIV TEMPERATURNE NA PRIČETEK MERITVE

Slika A1: Prikaz različne dolžine časovnega intervala pred pričetkom meritve, kot posledice temperaturne spremembe nastavitve aparature.

A) Temperatura meritve 22,8 -23°C



B) Temperatura meritve 28 -28,6°C



LEGENDA

| | | | |
|--|-----------------------------------|--|---|
| | Čas vpetega ploščice in stresanja | | Čas meritve ene luknjice |
| | Čas premora pred prvim ciklom | | Čas premika senzorja po 1, 2 in 3 meritvi |
| | Čas prvega premika senzorja | | Čas zadnjega premika senzorja cikla |
| | Čas premora po prvem premiku | | Čas zadnjega premika senzorja meritve |
| | Čas prvega premika senzorja cikla | | Čas premika ploščice iz aparature |

PRILOGA B

PREGLED IN IZBIRA METODE OBDELAVE PODATKOV

Podatki so predstavljeni na eksperimentalnem primeru treh meritev s hkratno analizo štirih vzorcev, pri čemer je meritev posameznega vzorca potekala 3 s in je bila ponovljena v šestih ciklih. Ostali parametri so bili čimbolj konstantni. Preglednica B1 prikazuje meritev vzorca z odgovarjajočimi časi in vrednostjo luminiscence v RLU. Opazimo lahko, da je razlika v času med meritvijo 1. cikla vzorca (Y) in meritvijo 1. cikla slepega vzorca (SV) okoli 10 s. Reakcija je potekala tako 10 s dlje v primeru SV v primerjavi z vzorcem Y. Ker luminiscenca eksponencialno upada v času, se je zaradi zakasnjene meritve zgodil določen upad. To je eden izmed razlogov, zakaj preprosta primerjava vrednosti ni najboljša opcija. Opazimo lahko tudi variacije v pričetku meritve ciklov med meritvami. Vidimo, da se tretji cikel meritve vzorca Y prične v primeru prve meritve po 132 s po pričetku reakcije, v primeru druge meritve po 131 s in v tretjem primeru po 130 s. Vse omenjene dejavnike je potrebno upoštevati pri meritvi.

B.1) Primerjava prve meritve prvega cikla vzorca s prvo meritvijo prvega cikla standarda

Zanima nas razmerje med *vzorcem Y* (V_{RLU}) in *slepim vzorcem* (SV_{RLU}), pri čemer razmerje označimo z x :

Splošno zapišemo:

$$x = \frac{V_{RLU}}{SV_{RLU}} \quad \dots(2)$$

Za prvo meritev tako izračunamo,

$$x = \frac{90 RLU}{172 RLU} = 0,523$$

Rezultat srednje vrednosti (N=3) \pm S.E, (% S.E/Avr.) : **0,753 \pm 0,179 (23,8%)**.

Preglednica B1: Pregled eksperimentalnih podatkov luminiscence (v RLU) treh meritev s hkratno analizo štirih vzorcev (okuženi vzorec (Y), slepo inokulirani vzorec (S), vzorec intaktnih rastlin (K) in slepi vzorec (SV)) z odgovarjajočimi časi.

| Luknjica | vzorec | | Meritev 1 | | Meritev 2 | | Meritev 3 | |
|----------|--------|---------|---------------------|-----|---------------------|-----|---------------------|-----|
| | | | začetek meritve (s) | RLU | začetek meritve (s) | RLU | začetek meritve (s) | RLU |
| 1 | Y | 1.cikel | 60 | 90 | 60 | 107 | 60 | 197 |
| | | 2.cikel | 96 | 64 | 95 | 68 | 95 | 141 |
| | | 3.cikel | 132 | 44 | 131 | 44 | 130 | 100 |
| | | 4.cikel | 268 | 36 | 166 | 30 | 165 | 80 |
| | | 5.cikel | 204 | 27 | 202 | 28 | 200 | 51 |
| | | 6.cikel | 240 | 25 | 238 | 20 | 235 | 41 |
| 2 | S | 1.cikel | 63,46 | 130 | 63,46 | 151 | 63,46 | 101 |
| | | 2.cikel | 99,46 | 85 | 98,46 | 94 | 98,46 | 59 |
| | | 3.cikel | 135,46 | 62 | 134,46 | 69 | 133,46 | 43 |
| | | 4.cikel | 171,46 | 43 | 169,46 | 50 | 168,46 | 32 |
| | | 5.cikel | 207,46 | 39 | 205,46 | 42 | 204,46 | 19 |
| | | 6.cikel | 243,46 | 28 | 241,46 | 28 | 238,46 | 16 |
| 3 | K | 1.cikel | 66,92 | 84 | 66,92 | 160 | 66,92 | 205 |
| | | 2.cikel | 102,92 | 46 | 101,92 | 97 | 101,92 | 121 |
| | | 3.cikel | 138,92 | 29 | 137,92 | 63 | 136,92 | 99 |
| | | 4.cikel | 174,92 | 19 | 172,92 | 47 | 136,92 | 63 |
| | | 5.cikel | 210,92 | 15 | 208,92 | 34 | 171,92 | 47 |
| | | 6.cikel | 246,92 | 14 | 244,92 | 29 | 206,92 | 44 |
| 4 | SV | 1.cikel | 70,38 | 172 | 70,38 | 170 | 70,38 | 178 |
| | | 2.cikel | 106,38 | 150 | 105,38 | 154 | 105,38 | 155 |
| | | 3.cikel | 142,38 | 128 | 141,38 | 132 | 140,38 | 143 |
| | | 4.cikel | 178,38 | 107 | 176,38 | 110 | 175,38 | 118 |
| | | 5.cikel | 214,38 | 94 | 212,38 | 99 | 210,38 | 107 |
| | | 6.cikel | 250,38 | 81 | 248,38 | 88 | 245,38 | 95 |

B.2) Metoda primerjave vsote ciklov vzorca z vsoto ciklov standarda

Zanima nas razmerje med vsoto ciklov vzorca Y ($\sum_{i=1}^n V_{RLU}$) in vsoto ciklov slepega vzorca

SV ($\sum_{i=1}^n SV_{RLU}$), pri čemer razmerje označimo z x :

Splošno zapišemo :

$$x = \frac{\sum_{i=1}^n V_{RLU}}{\sum_{i=1}^n SV_{RLU}} \quad \dots(3)$$

Pri čemer n predstavlja število ciklov.

Za prvo meritev tako izračunamo,

$$x = \frac{286RLU}{732RLU} = 0,391$$

Rezultat srednje vrednosti ($N=3$) \pm S.E, (% S.E/Avr.) : **0,517 \pm 0,125 (24,08%)**.

B.3) Metoda primerjave ploščine vzorca s ploščino standarda

Splošen potek :

Najprej je potrebno narisati graf vseh meritev. Ugotovili smo, da luminiscenca upada po funkciji $Y = Y_0 + Ae^{-bx}$, zato narišemo graf na omenjeno krivuljo in določimo vrednosti Y_0 , A in b (preglednica B2).

Preglednica B2: Prikaz podatkov potrebnih za izračun ploščine.

| | 1. Meritev | | 2. Meritev | | 3. Meritev | |
|-------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec |
| Y_0 | 17,4968 | $1,6500 \times 10^{-9}$ | 16,4599 | 1,0197 | $2,5343 \times 10^{-9}$ | $1,3943 \times 10^{-8}$ |
| A | 161,3990 | 233,1768 | 245,9950 | 225,0518 | 344,5983 | 233,4248 |
| b | 0,0133 | $4,2504 \times 10^{-3}$ | 0,0166 | $3,8988 \times 10^{-3}$ | $9,0993 \times 10^{-3}$ | $3,6856 \times 10^{-3}$ |

Sedaj je potrebno za vsak vzorec izračunati ploščino.

Ker se krivulja asimptotično približuje določeni vrednosti (Y_0) je možen le izračun med asimptoto in krivuljo, saj je ploščina med krivuljo in osjo x neskončno velika.

$$Y = Y_0 + Ae^{-bx} \quad \dots(4)$$

Najprej izračunamo nedoločni integral:

$$\int (Y_0 + Ae^{-bx}) dx = -\frac{A \times e^{-bx}}{b \times LN(e)} + \frac{A}{b \times LN(e)} + x \times Y_0 \quad \dots(5)$$

Vendar zaradi dejstva, da gre limita naše funkcije proti neskončnosti ni možno izračunati ploščine z mejami od 0 do ∞ oz. je le-ta neskončno velika.

Lahko pa izračunamo nedoločni integral naslednje funkcije:

$$\int (Ae^{-bx}) dx = -\frac{A \times e^{-bx}}{b \times LN(e)} + \frac{A}{b \times LN(e)} \quad \dots(6)$$

Za izračun ploščine je potrebno izračunati integral z mejami od 0 do ∞ .

Uporabimo podatke iz preglednice B2 in izračunamo ploščino p prikazano v preglednici B3.

Preglednica B3: Pregled izračunane ploščine vzorca Y in slepega vzorca (SV).

| | 1. Meritev | | 2. Meritev | | 3. Meritev | |
|--------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec |
| ploščina (p) | 1,2135x10 ⁴ | 5,486x10 ⁴ | 1,483x10 ⁴ | 5,772x10 ⁴ | 3,787x10 ⁴ | 6,333x10 ⁴ |

Zanima nas razmerje med ploščino vzorca Y (pV) in vsoto ciklov slepega vzorca (pSV), pri čemer razmerje označimo z x :

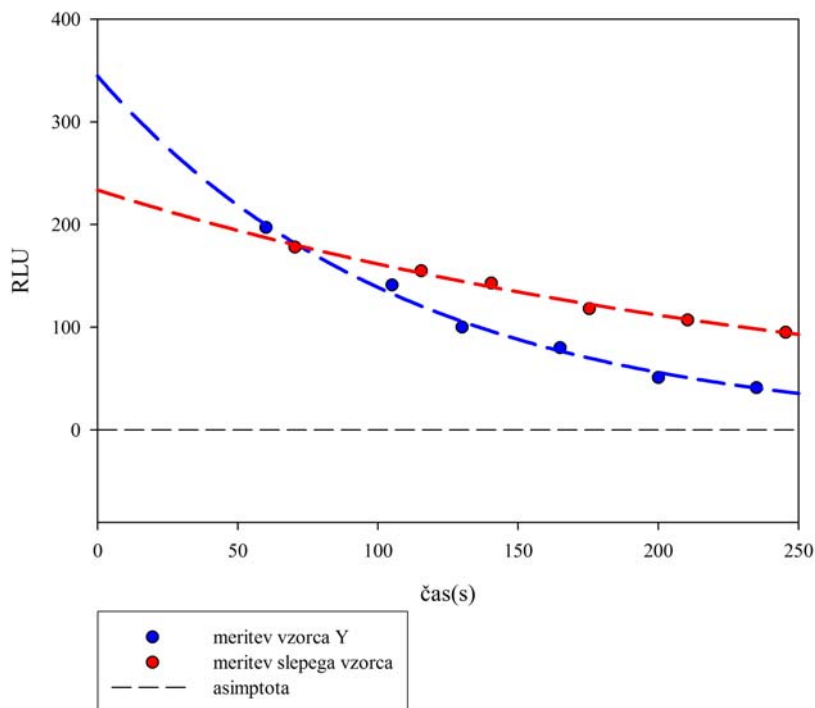
Splošno zapišemo :

$$x = \frac{pV}{pSV} \quad \dots(7)$$

Za prvo meritev tako izračunamo;

$$x = \frac{1,213 \times 10^4}{5,486 \times 10^4} = 0,221$$

Rezultat srednje vrednosti (N = 3) \pm S.E, (% S.E/Avr.) : **0,358 \pm 0,120 (33,47%)**.



Slika B1: Pregled ploščine upada vzorca Y in slepega vzorca tretje meritve.

Slika B1 prikazuje upad luminiscence slepega vzorca in vzorca Y tretje meritve. Pri prvi in drugi meritvi so vse vrednosti *vzorca Y*, pod vrednostjo (luminiscenco) *slepega vzorca* pri tretji meritvi pa je prva vrednost *vzorca Y* nad prvo vrednostjo *slepega vzorca*, ostale pa so pod njo. Če narišemo graf opazimo, da krivulja *vzorca Y* seka krivuljo *slepega vzorca*. Kljub temu, da je pred časom 70,38 s krivulja *vzorca Y* nad krivuljo *slepega vzorca*, torej je v tem delu tudi ploščina večja v primerjavi s ploščino *slepega vzorca*, pa je zaradi razlike upada luminiscence od časa 70,38 s do neskončnosti večja ploščina *slepega vzorca*.

B.4) Metoda ekstrapolacije merjenih podatkov na čas 0 s

Zanima nas razmerje med luminiscenco *vzorca Y* (V_{RLU0}) v času 0 s in *slepim vzorcem* (SV_{RLU0}) v času 0 s, pri čemer razmerje označimo z x :

Splošno zapišemo :

$$x = \frac{V_{RLU0}}{SV_{RLU0}} \quad \dots(8)$$

Za prvo meritev tako izračunamo;

$$x = \frac{178,9RLU}{233,2RLU} = 0,767$$

Preglednica B4: Izračunane vrednosti luminiscence v času 0 s z izmerjenimi vrednosti meritve v RLU.

| | 1. Meritev | | 2. Meritev | | 3. Meritev | |
|---------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec |
| meritev | 90 | 172 | 107 | 170 | 197 | 178 |
| čas 0 s | 178,9 | 233,2 | 262,5 | 226,0 | 344,6 | 233,4 |

Rezultat srednje vrednosti ($N = 3$) \pm S.E, (% S.E/Avr.) : **1,135 \pm 0,205 (18,7%)**.

(1) Dodatna utemeljitev in preveritev natančnosti metode

Za naš primer lahko preverimo natančnost metode. Vzemimo za hipotetični primer, meritve le petih ciklov, pri čemer ne začnemo meriti prvi vzorec v času prvega cikla ampak v času drugega cikla. Vzemimo torej, popolnoma enake eksperimentalne podatke kot jih imamo le, da ne upoštevamo prvega cikla v vseh merjenih vzorcih. Sedaj pa se vprašajmo kako natančno lahko iz podatkov 5-ih ciklov določimo 1 cikel. Torej:

1. narišemo točke na graf in narišemo krivuljo $Y = Y_0 + Ae^{-bx}$ za vsak vzorec posebej vendar le za zadnjih 5 ciklov;
2. računalniško določimo vrednosti Y_0 , A in b za vsak vzorec posebej;
3. določimo vrednost luminiscence v času prvega cikla meritve za vsako luknjico posebej.

Sedaj pa je potrebno izračunati še Y , torej luminiscenco za odgovarjajoče čase ob upoštevanju enačbe $Y = Y_0 + Ae^{-bx}$. Ker je bila meritev prvega cikla vzorca Y opravljena v času 60 s upoštevamo za izračun luminiscence prvega cikla ta čas, v primeru slepega vzorca pa čas 70,38 s.

1. Meritev

a) vzorec Y

$$Y = 20,1540RLU + 196,3142e^{-60 \cdot 0,0157} RLU$$

b) slepi vzorec

$$Y = 30,9713RLU + 226,2064e^{-70,38s \cdot 0,0060157} RLU$$

Po enakem postopku izračunamo še ostale vrednosti. Izračunane vrednosti so prikazane v preglednici B5.

Preglednica B5: Primerjava izmerjene in na čas prvega cikla preračunane luminiscence izražene v RLU.

| | 1. Meritev (RLU) | | 2. Meritev (RLU) | | 3. Meritev (RLU) | |
|----------------------------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec | vzorec Y | slepi vzorec |
| Izmerjena vrednost prvega cikla | 90 | 172 | 107 | 170 | 197 | 178 |
| Izračunana vrednost prvega cikla | 96,8 | 179,1 | 112,5 | 186,1 | 192,2 | 178,1 |

Preglednica B6: Pregled povprečne vrednosti na čas prvega cikla izračunane luminiscence in izmerjene luminiscence izražene v RLU.

| | Povprečna vrednost RLU (N=3) ± S.E (%S.E./Aver.) | |
|-------------------|--|----------------------------------|
| | izmerjena vrednost prvega cikla | Izračunana vrednost prvega cikla |
| vzorec Y | 131,3 ± 33,2 (24,9%) | 133,9 ± 29,5 (22,3%) |
| slepi vzorec (SV) | 173,3 ± 2,4 (1,4%) | 181,1 ± 2,1 (1,2%) |

Standardna napaka (S.E.) ocene *vzorca Y* je 2%, standardna napaka ocene *slepega vzorca* pa 4,5%. Bolj kot sama standardna napaka *vzorca Y* ali *slepega vzorca* nas zanima končna standardna napaka, torej napaka ocene koncentracije oz. v našem primeru razmerja med *vzorcem Y* in *slepim vzorcem*.

Če primerjamo napako končnega rezultata (preglednica B7) ugotovimo, da je napaka pri povprečno izračunani vrednosti okoli 1,6 %. Potrebno je upoštevati, da je časovni interval ekstrapolacije, torej časovni interval za katerega preračunamo luminiscenco »nazaj« v primeru prve meritve 36 s oz. 35 s (2. in 3. meritve). V naših ekstrapolacijah uporabljenih za izračun luminiscence rastlinskega materiala na čas 0 s pa je bil ta čas daljši in odvisen od pozicije vzorčka. Tako je bil interval med časom 0 s in prvo meritvijo 60 s, interval med zadnjo merjeno luknjico prvega cikla in časom 0 s pa variabilen v okolici 70 s. Potrebno je upoštevati, da je napaka v primeru daljšega intervala, uporabljenega za izračun luminiscence v času 0 s, verjetno višja.

Preglednica B7: Pregled razmerja med vzorcem Y in slepim vzorcem za izmerjeno in izračunano vrednost prvega cikla.

| | Vzorec Y/slepi vzorec | | | Povprečje ± S.E |
|----------------------------------|-----------------------|------------|------------|-----------------------|
| | 1. Meritev | 2. Meritev | 3. Meritev | |
| izmerjena vrednost prvega cikla | 0,523 | 0,629 | 1,107 | 0,753 ± 0,179 (23,8%) |
| izračunana vrednost prvega cikla | 0,540 | 0,605 | 1,079 | 0,741 ± 0,169(22,9%) |

Vprašati se moramo kolikšna je napaka če uporabimo drugo »najboljšo« metodo in zanemarimo njene pomanjkljivosti. Izmed omenjenih metod je druga najprimernejša *metoda primerjave meritve prvega cikla vzorca z meritvijo prvega cikla slepega vzorca*. V našem primeru, torej primerjamo rezultate našega hipotetičnega prvega cikla oz. dejansko izmerjenega drugega cikla, katere podatke dobimo pri meritvi. Tako izračunamo:

$$x_1 = \frac{64RLU}{150RLU} = 0,427, \quad x_2 = \frac{68RLU}{154RLU} = 0,442, \quad x_3 = \frac{141RLU}{155RLU} = 0,91$$

In dobimo rezultat ($N = 3$) \pm S.E, (% S.E/Avr.) : $0,593 \pm 0,159$ (26,76%).

Če upoštevamo drugo »najprimernejšo« metodo dobimo končni rezultat, kateri za 21, 3% odstopa od dejansko izmerjenega rezultata v času prvega cikla. Če upoštevamo, da je pretekel čas od začetka reakcije do merjenja minimalno 60 s, v našem »hipotetičnem primeru« pa le 35 oz. 36 s, lahko pričakujemo še večjo napako, torej še večjo podcenitev našega rezultata, v primeru uporabe druge »najprimernejše« metode. Z metodo ekstrapolacije luminiscence na čas prvega cikla pa naredimo napako okoli 1,6%, zato je omenjena metoda več kot primerna za izračun rezultata naših meritev.

V primeru, ko smo merili standard visokih koncentracij vodikovega peroksida v 10-ih ciklih, saj je le pri visokih koncentracijah moč meriti luminiscenco dalj časa, in smo nato iz zadnjih šestih ciklov izračunali vrednost v tretjem ciklu, smo dobili razmerje med napako ocene in dejansko meritvijo v intervalu med -8,13% do - 0,6%. Podatek napake je pomemben saj je omenjeni časovni interval (med 6-im in 3-jim ciklom) podoben našim časovnim intervalom ekstrapolacije uporabljene na čas 0 s in tako podaja približno oceno napake v ekstrapolaciji luminiscence standarda.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matej ŠUŠTARŠIČ

**UVEDBA LUMINISCENČNE METODE ZA
MERJENJE VODIKOVEGA PEROKSIDA V
ZDRAVIH IN OKUŽENIH LISTIH KROMPRIJA
(*Solanum tuberosum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008