

Laboratorium 8

Badanie stresu oksydacyjnego jako efektu działania czynników toksycznych

Literatura zalecana:

Jakubowska A. 2016. Ocena toksyczności wybranych cieczy jonowych. Rozprawa doktorska. str. 28 – 31. Politechnika Śląska. Gliwice.

Zadanie 1. Badanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: CAT, SOD i GST w organizmach testowych (*Daphnia magna* i *Lemna minor*) poddanych działaniu insektycydu ProAgro i herbicydu Roundup (glifosat)

Badanie prowadzi się na organizmach testowych poddanych działaniu stężeń subletalnych LC(IC)₁₀.

Badania na rozwieltkach (*Daphnia magna*)

Odczynniki, szkło laboratoryjne:

Insektycyd r-r wyjściowy: 125 cm³ w 2 dm³ wody

Herbicyd r-r wyjściowy: 40 cm³ na 1 dm³ wody

bufor 0,06 M sodowo-fosforanowy o pH 7,4

bufor 0,05 M węglanowy o pH 10,2

bufor 0,1 M potasowo-fosforanowy o pH 6,5

32,4 mM molibdenian (VI) amonu (NH₄)₆Mo₇O₂₄

65 mM H₂O₂ w 0,06 M buforze sodowo-fosforanowym o pH 7,4

adrenalina

40 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzen (CDNB) w 99% alkoholu etylowym

Glutation GSH

naczyńka (np. małe zlewki, krystalizatoriki lub szalki), probówki, pipety automatyczne, wirówka

Wykonanie:

1. Wyselekcjonować osobniki 4-5 dniowe.
2. Przygotować roztwory badanej substancji w napowietrzanej wodzie wodociągowej w stężeniach: LC_{10/24} i LC_{10/48} i wlać je do małych naczynek (każde stężenie do 4 naczynek – 4 powtórzenia (3 do badań poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych i 1 do badania poziomu wolnych rodników – zadanie późniejsze).
3. Przygotować też 4 próby kontrolne z wody użytej do wykonania rozcieńczeń.
4. Do wszystkich naczynek wprowadzić po 25 rozwielitek i poddać je ekspozycji przez odpowiednio: 24 (dla LC_{10/24}) i 48 godzin (dla LC_{10/48}).

5. Po zakończeniu ekspozycji wykonać ekstrakty enzymatyczne (homogenaty) z osobników testowych, które przeżyły. Homogenaty przygotować osobno dla każdego powtórzenia i w odpowiednim buforze dla każdej badanej aktywności enzymatycznej:
 - do oznaczania katalazy (CAT) – bufor 0,06 M sodowo-fosforanowy o pH 7,4
 - do oznaczania dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – bufor 0,05 M węglanowy o pH 10,2
 - do oznaczania S-transferazy glutationowej (GST) – bufor 0,1 M potasowo-fosforanowy o pH 6,5.
6. Osobniki homogenizować w 1 cm³ schłodzonego buforu.
7. Uzyskane homogenaty odwirować przez 20 min., przy 4000 rpm, w temp. 4°C. Otrzymane supernatanty wykorzystać do oznaczania aktywności enzymatycznych.
8. Przed przystąpieniem do oznaczania aktywności enzymów wykonać pomiar ilości białka w uzyskanych supernatantach.

Pomiar zawartości białka w supernatantach metodą Bradforda

Metoda polega na zdolności łączenia się białka z barwnikiem Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB) i tworzenia z nim niebieskiego kompleksu. Intensywność zabarwienia tego kompleksu jest wprost proporcjonalna do ilości białka. Zawartość białka w badanej próbce określa się ostatecznie korzystając z krzywej kalibracyjnej wyznaczonej na podstawie reakcji barwnika ze znanymi ilościami białka wzorcowego (albuminy wołowej).

Odczynniki:

etanol

85% H₃PO₄ – kwas ortofosforowy

Wzorcowa albumina wołowa (BSA)

odczynnik Bradford: 100mg CBB rozpuścić w 50 cm³ etanolu, dopełnić wodą do 600 cm³.

Dodać 100 cm³ 85% H₃PO₄ i całość dopełnić do 1000 cm³,
probówki Eppendorfa, pipety

Wykonanie:

1. W małych probówkach przygotować r-y o objętości 1 cm³:
 - r-y BSA do wyznaczenia krzywej wzorcowej (kalibracyjnej): 00; 25; 50; 100; 125; 200; 250; 375; 500 ng/cm³
 - badane supernatanty (ewentualnie ich rozcieńczenia)
2. Do probówki Eppendorfa przenieść pipetą po 100 μl przygotowanych próbek i dodać po 1 cm³ odczynnika Bradford. Wymieszać i pozostawić na 5 min. w temp. pokojowej.

3. Zmierzyć absorpcję wszystkich roztworów w spektrofotometrze przy długości fali $\lambda = 595$ nm.
4. Sporządzić krzywą wzorcową (zależność absorbancji od stężenia białka wzorcowego BSA) i na jej podstawie określić zawartość białka w supernatantach. Uzyskane wartości będą użyte do określania aktywności badanych enzymów.

Pomiar aktywności katalazowej (CAT)

Metoda polega na łączeniu się H_2O_2 nie rozłożonego przez katalazę, z molibdenianem (VI) amonu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, w barwny kompleks, który można zmierzyć spektrofotometrycznie.

1. Do probówki wprowadzić 200 μl uzyskanego wcześniej ekstraktu enzymatycznego i 1 cm^3 świeżo przygotowanego substratu reakcji (65 mM H_2O_2 w 0,06 M buforze sodowo-fosforanowym o pH 7,4).
2. Mieszaninę reakcyjną inkubować przez 1 min. w łaźni wodnej o temp. 37°C.
3. Zatrzymać reakcję dodając 1 cm^3 32,4 mM molibdenianu (VI) amonu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$.
4. Zmierzyć absorbancję próby przy długości fali $\lambda = 405$ nm względem próby ślepej, w której zamiast ekstraktu enzymatycznego zastosować 200 μl 0,06 M buforu sodowo-fosforanowym o pH 7,4. Aktywność CAT wyrazić w jednostce [$\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$].

Pomiar aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Metoda wykorzystuje samoczynne zachodzenie reakcji utleniania adrenaliny do adenochromu w pH 10,2. Produktem tej reakcji jest anion ponadtlenkowy unieczynniany przez SOD. Miarą aktywności tego enzymu jest więc szybkość hamowania utleniania adrenaliny.

1. Do probówki (kuwety) wprowadzić 2,8 cm^3 buforu węglanowego o pH 10,2, 100 μl ekstraktu enzymatycznego oraz 100 μl adrenaliny.
2. Prowadzić pomiar absorbancji próby co minutę, przez 4 minuty, przy $\lambda = 480$ nm pod względem próby ślepej zawierającej 2,9 cm^3 buforu 0,05 M węglanowego o pH 10,2 oraz 100 μl adrenaliny.
3. Aktywność SOD wyrazić w jednostce [$\text{JA}/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$]. Jedna JA (jednostka aktywności) oznacza ilość enzymu powodującą inhibicję autooksydacji adrenaliny o 50% w czasie 1 min. w porównaniu z próbą kontrolną.

Pomiar aktywności S-transferazy glutationowej (GST)

GST katalizuje reakcję utleniania zredukowanej formy glutationu (GSH) w reakcji z nukleo- i elektrofilowymi związkami. Jako substrat reakcji stosowany jest 1-chloro-2, 4-dinitrobenzen (CDNB). Produktem reakcji jest barwny kompleks 2,4-dinitrofenylo-S-glutation.

1. Do probówki (kuwety) wprowadzić 600 μ l 0,1 M buforu potasowo-fosforanowego o pH 6.5, 200 μ l ekstraktu enzymatycznego oraz 100 μ l 10 mM GSH.
2. Bezpośrednio przed pomiarem dodać 100 μ l 40 mM r-u CDNB w 99% alkoholu etylowym i mierzyć absorbancję co 1 minutę przez 5 minut, przy $\lambda = 340$ nm względem próby ślepej zawierającej 800 μ l 0,1 M buforu potasowo-fosforanowego o pH 6.5, 100 μ l 10 mM GSH oraz 100 μ l 40 mM r-u CDNB.
3. Aktywność enzymu obliczyć za pomocą równania:

$$A = \Delta A \cdot V_k / k \cdot t \cdot b$$

gdzie:

ΔA – zmiana absorbancji próbki,

V_k – objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej [ml]

k – współczynnik ekstynkcji równy 9,6 [mM/cm]

t – czas pomiaru [min]

b – stężenie białka w mieszaninie reakcyjnej

4. Aktywność GST wyrazić jako [μ M CDNB/min/mg_{białko}]

Badania na rzęsie drobnej (*Lemna minor*)

Odczynniki, szkło laboratoryjne:

Pożywka 20 x AAP

Szalki Petriego

Wykonanie:

1. Wyselekcjonować rośliny z dwoma „listkami”.
2. Przygotować roztwór badanej substancji w pożywce 20 x AAP na bazie napowietrzanej wody wodociągowej w stężeniu $IC_{10/7d}$ i rozlać go do 4 szalek Petriego (3 szalki do badań poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych i 1 do badania poziomu wolnych rodników – zadanie następne).
3. Przygotować też 4 próby kontrolne z pożywki użytą do wykonania rozcieńczeń.
4. Do wszystkich naczynek wprowadzić po 15 roślin i eksponować je przez tydzień w temp. $22 \pm 1^{\circ}C$ i w warunkach naświetlenia 16h : 8h światło/ciemność

5. Po zakończeniu ekspozycji wykonać ekstrakty enzymatyczne (homogenaty) z osobników testowych. Homogenaty przygotować osobno dla każdego powtórzenia i w odpowiednim buforze dla każdej badanej aktywności enzymatycznej:
 - do oznaczania katalazy (CAT) – bufor 0,06 M sodowo-fosforanowy o pH 7,4
 - do oznaczania dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) – bufor 0,05 M węglanowy o pH 10,2
 - do oznaczania S-transferazy glutationowej (GST) – bufor 0,1 M potasowo-fosforanowy o pH 6,5.
6. Osobniki homogenizować w 1 cm³ schłodzonego buforu.
7. Uzyskane homogenaty odwirować przez 20 min., przy 4000 rpm, w temp. 4°C. Otrzymane supernatanty wykorzystać do oznaczania aktywności enzymatycznych.
8. Pomiar aktywności enzymatycznych wykonać tak jak w przypadku rozwiłitek (patrz wyżej).

Zadanie 2. Badanie poziomu wolnych rodników (ROS) w organizmach testowych (*Daphnia magna* i *Lemna minor*) poddanych działaniu insektycydu ProAgro i herbicydu Roundup

Metoda wykorzystuje reakcję hydrolizy dioctanu 2',-7' – dichlorofluoresceiny (DCHF-DA), którą przeprowadzają esterazy obecne w komórkach. Esterazy odłączają od DCHF-DA część octanową uwalniając produkt, który jest utleniany przez wolne rodniki (ROS) do związku wykazującego fluorescencję (2',-7' – dichlorofluoresceina). Pomiar wielkości fluorescencji jest miarą poziomu wolnych rodników wytworzonych przez badany związek toksyczny.

Odczynniki, szkło laboratoryjne:

Bufor PBS:

W 800 cm³ wody destylowanej rozpuścić:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Po dodaniu składników należy dostosować pH do 7,4 za pomocą HCl lub NaOH. Uzpełnić wodą destylowaną do objętości 1 litra, a następnie wysterylizować przez autoklawowanie.

Bufor pH 7,4: 0,01 M Tris-HCl; 0,1 mM EDTA-2 Na; 0,01 M sacharoza; 0,8 % NaCl, dioctan 2',-7' – dichlorofluoresceiny (DCHF-DA) (5 µg/cm³ DMSO) homogenizator, wirówka, pipety automatyczne, czarne płytki 96-dołkowe

Wykonanie:

1. Po zakończeniu ekspozycji (jak w zadaniach wyżej – czwarte powtórzenie) wykonać ekstrakty enzymatyczne (homogenaty) z osobników testowych i kontrolnych. Homogenaty przygotować po dwukrotnym przepłukaniu organizmów testowych schłodzonym buforem PBS. Homogenizację przeprowadzić w zimnym buforze o pH 7,4. Homogenaty wirować w temp. 4°C przez 30 min., przy 12 000 rcf. Badanie ROS wykonać na uzyskanych supernatantach.
2. Do dołków płytki 96-dołkowej wprowadzać po:
 - 20 μ l supernatantu,
 - 100 μ l PBS,
 - 10 μ l DCHF-DA w stężeniu 5 μ g/cm³ w DMSO.
3. Płytki zakryć czarnymi wieczkami i inkubować 30 min. w temp. 27°C.
4. Zmierzyć fluorescencję za pomocą czytnika mikropłytek z użyciem filtrów ekscytacji, przy długości fali $\lambda = 485 / 535$ nm odpowiednio. Porównać wartości fluorescencji próby badanej i kontrolnej, i wyciągnąć wnioski.