

Přílohy

Protokol na měření markerů oxidativního poškození

Materiál:

Reagencie

Fosfátový pufr, PBS: 137mM NaCl (Penta), 2,7mM KCl (Penta), 10mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O (*), 1,8mM KH₂PO₄ (*), pH 7,4,

inhibitor proteáz cOmplete a inhibitor fosfatáz PhosSTOP (obojí Roche): pracovní roztoky (1 tableta rozpuštěna v 1 ml H₂O)

hovězí sérový albumin, BSA (*): zásobní roztok o koncentraci 1 µg/ µl

reagent A: 8mM Na₂CO₃ (*), 0,8mM C₄H₄Na₂O₆ (Penta), pH 11,25

reagent B: 1,2mM (HO₂CC₉H₅N)₂ (*)

reagent C: 0,03mM CuSO₄ x 5H₂O (Lach-Ner)

redukovaný glutathion, GSH (*): zásobní roztok o koncentraci 1 mM

trichloroctová kyselina, TCA (*): 10% (w/v) pracovní roztok

hydrogenfosforečnan sodný (*): pracovní roztok o koncentraci 0,5 M a pH 8,4

citrát sodný (*): 1% (w/v) pracovní roztok

5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, DTNB (*): pracovní roztok o koncentraci 1 mM (připraven do 1% citrátu sodného)

Dimethylsulfoxid, DMSO (*)

2-Thiobarbiturová kyselina, TBA (*): 0,67% (w/v) pracovní roztok (67 mg TBA v 1 ml DMSO + 9 ml H₂O)

Ethanol (Penta)

Malondialdehyd (1,1,3,3-Tetramethoxypropan), MDA (*): zásobní roztok o koncentraci 500µM (4,167 µl MDA + 1 ml ethanol + 49 ml H₂O)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner): pracovní roztok o koncentraci 2,5 M

2,4-dinitrofenylhydrazin, DNPH (*): pracovní roztok o koncentraci 10 mM (8 mg DNPH + 40 µl DMSO + 3,96 ml 2,5M HCl)

Hydroxid sodný (Penta): pracovní roztok o koncentraci 6 M

Kapalný dusík (Linde)

V závorkách uveden výrobce, hvězdička (*) značí zakoupení u Sigma-Aldrich

Přístrojové a programové vybavení

Analytické váhy (Scaltec SBA 33, Sartorius), Potter-Elvehjemův sklo-teflonový homogenizátor (Eurostar power b, IKA labortechnik), stolní centrifuga na mikrozkušavky (MIKRO 200R, Hettich), vortex (Velp scientifica), topný blok (Dri-Block®, TECHNE), multifunkční čtečka 96-jamkových destiček (Synergy HT, Biotek), program GEN 5, program GraphPad Prism

Vzorky

Vejce gekončků nočních (*Eublepharis macularius*) z teplot 28 °C a 32 °C byla chemicky manipulována injekcí paraquat (a kontrolní injekcí destilovanou vodou) v době začátku termosenzitivní periody (tedy 12. – 14. den po naklazení, respektive 7. – 10. ve 32 °C). Dva dny po manipulaci byla embrya vyjmuta z vajec, přendána do 2ml zkumavky typu Eppendorf a metodou snap-freezing rychle zamražena ponořením zkumavky s embryem do tekutého dusíku. Zamražená embrya byla skladována před měřením v -80 °C.

Pracovní postup:

Příprava vzorků tkáňového homogenátu

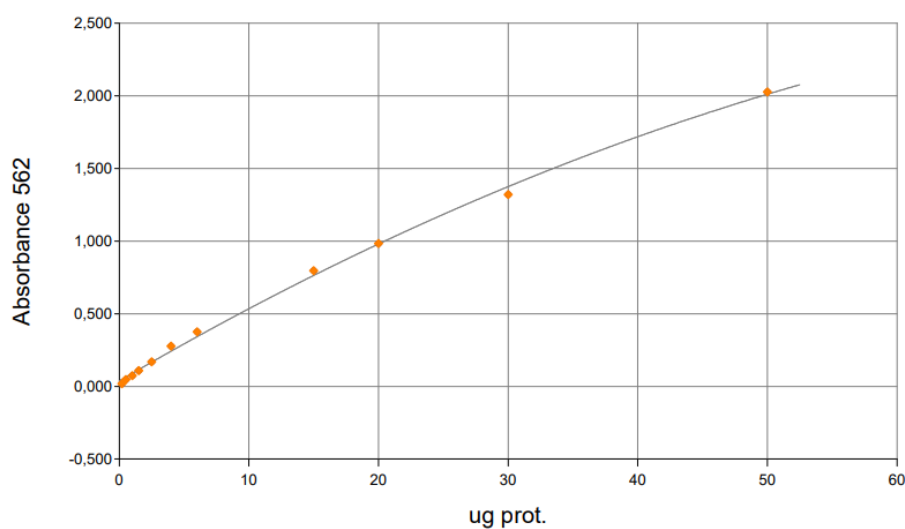
Gekoní embrya byla přesně zvážena a byl z nich pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (1200 otáček/min, 2 min, 4 °C) připraven 20% homogenát (w/v) v PBS pufru s přidavkem 2% inhibitoru proteáz cOmplete a 10% inhibitoru fosfatáz PhosSTOP. Takto připravené vzorky byly 2 minuty centrifugovány (2100 otáček/min, 10 minut, 4 °C) a vzniklý postnukleární supernatant byl odebrán a uchován při -80°C pro následné analýzy.

Stanovení celkové koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena BCA metodou (dle Walker 1994). V 96-jamkové destičce byla dle níže uvedené tabulky 12 připravena kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu (BSA). Do destičky byly dále pipetovány v triplicátech 100x ředěné vzorky tkáňového homogenátu vždy po 100 µl. Do všech jamek bylo následně pipetováno 100 µl směsi reagentu A, B a C v poměru 26:25:1. Celá destička byla překryta folií a byla inkubována v topném bloku 30 minut při 60°C. Pomocí spektrofotometru Synergy HT a programu GEN 5 byla následně při vlnové délce 562 nm změřena absorbance a spočítána celková koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích.

| Jamka č.: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|----|----|----|----|
| Množství BSA [µg] | 0 | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,5 | 4 | 6 | 10 | 15 | 20 | 30 | 50 |
| Pipetovaný objem [µl] BSA (0,1 µg/µl) | 0 | 2 | 5 | 10 | 15 | 25 | 40 | 60 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pipetovaný objem [µl] BSA (1 µg/µl) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 20 | 30 | 50 |
| Pipetovaný objem H₂O [µl] | 100 | 98 | 95 | 90 | 85 | 75 | 60 | 40 | 0 | 85 | 80 | 70 | 50 |

Tabulka 5 – kalibrační řada standardu hovězího sérového albuminu (BSA) pro stanovení celkové koncentrace proteinů metodou BCA



Curve Fitting Results

| Curve Name | Curve Formula | A | B | R2 |
|------------|-----------------|--------|--------|-------|
| Curve | $Y=C*X^2+B*X+A$ | 0,0378 | 0,0522 | 0,998 |

Graf 12 – závislost absorbance na celkové koncentraci proteinů, graf včetně regresních koeficientů byl vygenerován v programu GEN 5

Stanovení redukovaného glutathionu

Stanovení redukovaného glutathionu probíhalo dle Ellman (1959). Z gekoních tkáňových homogenátů byly připraveny vzorky o celkové koncentraci proteinů 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkovém objemu 200 μl . Dále byly ze zásobního roztoku standardu redukovaného glutathionu (GSH) připraveno vždy 200 μl kalibračních roztoků o koncentraci 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM a 200 μM . Ke vzorkům standardů a homogenátů bylo přidáno vždy 200 μl 10% trichloroctové kyseliny, vzorky byly promíchány, inkubovány 5 minut na ledu a zcentrifugovány (10000 otáček/min, 10 minut, 4 °C). Na 96-jamkovou destičku poté bylo v triplicátu pipetováno 100 μl kalibračních roztoků a vzorků homogenátu. Poté bylo do všech jamek pipetováno 100 μl 0,5M hydrogenfosforečnanu sodného a 20 μl 1mM kyseliny 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoové. Po desetiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla ve vzorcích standardů a homogenátů změřena absorbance při vlnové délce 412 nm a následně spočítána koncentrace redukovaného glutathionu a vztažena na množství proteinů ve vzorcích.

Stanovení malondialdehydu

Stanovení malondialdehydu (markeru peroxidace lipidů) probíhalo metodou TBARS (Esterbauer & Cheeseman 1990). Z tkáňových homogenátů byly připraveny vzorky o celkové koncentraci proteinů 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkovém objemu 100 μl . Dále byly ze zásobního roztoku standardu malondialdehydu (MDA) připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 0,078 μM , 0,156 μM , 0,313 μM , 0,625 μM , 1,25 μM , 2,5 μM a 5 μM o objemu 100 μl . Ke vzorkům standardů a homogenátů bylo přidáno vždy 200 μl 10% trichloroctové kyseliny a 300 μl 0,67% thiobarbiturové kyseliny, vzorky byly promíchány a inkubovány v topném bloku 30 minut při 100 °C. Poté byly vzorky zchlazeny na ledu a zcentrifugovány (10000 otáček/min, 10 minut, 4 °C). Na 96-jamkovou destičku vhodnou pro měření fluorescence poté bylo v triplicátu pipetováno 100 μl supernatantu kalibračních roztoků a vzorků homogenátu. Excitace probíhala při vlnové délce 540 nm a emise při vlnové délce 590 nm.

Stanovení karbonylových skupin

Stanovení karbonylových skupin (markeru karbonylace proteinů) pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu bylo provedeno dle Mesquita et al. (2014). Ke vzorkům tkáňových homogenátů o celkové koncentraci proteinů 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a objemu 200 μl bylo přidáno 200 μl 10mM 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) a vzorky byly v temnu při laboratorní teplotě inkubovány 10 minut. Po přidavku 100 μl 6M NaOH byly vzorky promíchány a opět inkubovány za stejných podmínek. Po promíchání bylo vždy v triplicátu na 96-jamkovou

destičku pipetováno 100 μl vzorku a při vlnové délce 450 nm byla změřena absorbance. Koncentrace karbonylových skupin byla z naměřené absorbance A vypočtena z Lambert-Beerova zákona dle níže uvedené rovnice s použitím molárního absorpčního koeficientu DNPH ϵ_{450} 22,308 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a délce absorpční vrstvy 1 0,2 cm.

$$A = \epsilon lc$$

Sledování konečných produktů pokročilé glykace

Stanovení konečných produktů pokročilé glykace probíhalo dle Ruggeri et al. (2016). Vzorky tkáňových homogenátů byly PBS pufrem naředěny na koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a celkový objem 320 μl . Poté byly v triplikátu pipetovány vždy po 100 μl do 96-jamkové destičky vhodné pro fluorescenční měření. Excitace probíhala při vlnové délce 360 nm a emise při vlnové délce 460 nm.

- Ellman G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70–77.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407–421.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*, 458, 69-71.
- Ruggeri, R. M., Vicchio, T. M., Cristani, M., Certo, R., Caccamo, D., Alibrandi, A., Giovinazzo, S., Saija, A., Campennì, A., Trimarchi, F., & Gangemi, S. (2016). Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products in Hashimoto's Thyroiditis. *Thyroid*, 26(4), 504–511.
- Walker J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in molecular biology*, 32, 5–8.