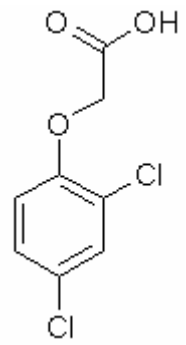
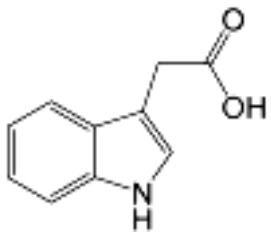
EXTRAKCE, PURIFIKACE A ELISA STANOVENÍ OBSAHU 2,4-D V PROCESU DEDIFERENCIACE *IN VITRO*

2,4-DICHLORFENOXYOCTOVÁ KYSELINA

2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (**2,4-D**) je chlorem substituovaná aromatická sloučenina spojená etericko u vazbou s alkylkarboxylovou skupinou (konkrétně kyselinou). Je to bílá krystalická látka, poměrně stabilní, rozkládá se působením UV záření a při velmi nízkém pH. Její M_r = 221, je dobře rozpustná v organických rozpouštědlech. Je látkou jen slabě polární (přítomnost karboxylové skupiny) a nepatrně lipofilní (aromatické jádro). Její fyziologická (auxinová, herbicidní) aktivita je dána substitucí chlorem v polohách C2 a C4 aromatického jádra.



2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina



indolyl-3-octová kyselina

FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY 2,4-D V ROSTLINÁCH

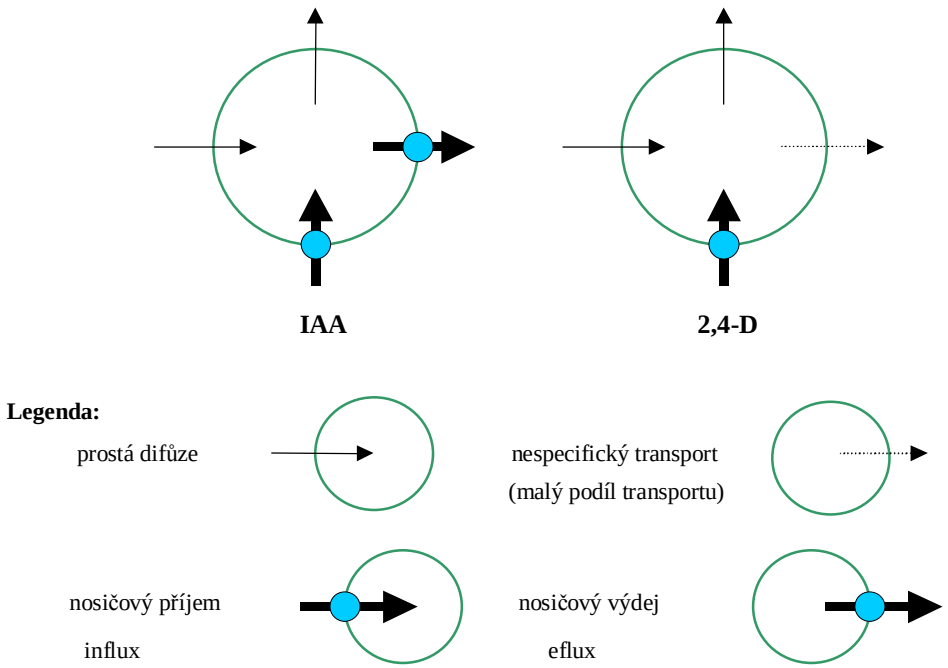
Fyziologická a **herbicidní** **aktivita** 2,4-D se rozlišuje v podstatě na základě morfologického účinku. Vyšší koncentrace 2,4-D často užívané pro herbicidní aplikaci mají morforetardační účinky (fasciace v růstu, srůsty, ancestrální tvary a abnormity). Fyziologické účinky nižších koncentrací jsou využívány v indukci dediferenciace a morfogeneze *in vitro* - nachází své uplatnění v indukci tvorby buněčných suspenzí, kalusu, kořenů a somatických embryí.

V rostlinách se 2,4-D intenzivně **metabolizuje**, ovlivňuje endogenní hladiny IAA (indolyl-3-octová kyselina), ABA i cytokininů a produkci etylénu v buňkách, především jako reakci na stres, způsobený její toxicitou. Její soli jsou méně (Na^+, K^+) nebo srovnatelně aktivní (NH_4^+), estery nižší (Me-2,4-D, metylester-2,4-D) jsou pro rostliny silně toxické, vyšší méně toxické až netoxické. Inaktivace v rostlinách probíhá cestou degradace 2,4-D β-oxidací na 2,4-dichlorfenol a metabolicky tvorbou polárních konjugátů.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Z hlediska příjmu a transportu v rostlinách je 2,4-D přijímána **usnadněnou difůzí** v nedisociované formě a je akumulována v protoplastu. Vzájemnou relaci příjmu a výdeje (translokace) auxinů (2,4-D a IAA) přes plasmatickou membránu lze vyjádřit následujícím schématem:

Schéma translokace 2,4-D a IAA rostlinnou buňkou



V rostlinách kontroluje polární transport auxinových látek řadu fyziologických projevů rostlin. Princip polárního transportu je dán souhrou a aktivitou přenašečových membránových systémů. Je známo, že polární transport auxinů řídí procesy buněčné elongace, kambiálního dělení a vaskulární diferenciace.V kulturách *in vitro* nemusí být transport růstových regulátorů auxinového typu vždy polární a navíc může být v případě izolovaných orgánů (jako primárních explantátů) řízen procesy translokace látek floémem a xylémem.

STANOVENÍ 2,4-D V ROSTLINNÝCH VZORCÍCH

2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinu je možno stanovit v rostlinných vzorcích v důsledku její stability při extrakci z rostlinného materiálu poměrně širokým spektrem metod jak instrumentálních (HPLC, LC/MS, CE) tak imunoanalytických (RIA, ELISA). Nejprve je však nutné 2,4-D z rostlinného materiálu extrahovat a purifikovat podle nároků finální kvantifikační metody. 2,4-D je dobře extrahovatelná organickými rozpouštědly (metanol, dichlormetan aj.) v nichž ji lze zakoncentrovat odpařením rozpouštědla ve vakuu. Vhodné je odstranění lipidické složky s lipofilními barvivy chromatograficky (C18 chromatografie). ELISA a RIA nevyžadují speciální čištění.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

IMUNOANALYTICKÉ METODY

Základem **imunoanalytických metod** je kompetitivní reakce antigenu (či haptenu) a značeného antigenu (haptenu) se specifickými rozpoznávacími místy protilátky. Kompetitivní reakce antigenu (haptenu) a jeho značeného analoga s protilátkou je imunoprecipitace a probíhá do ustavení precipitační rovnováhy. Nejčastěji se používá dvojího značení antigenů (haptenů) - pokud je na hapten navázán radioizotop, pak stanovení probíhá metodou **RIA** (radio immuno assay), jestliže je na hapten navázán enzym tak látku stanovíme metodou **ELISA** (enzyme linked immunosorbent assay). Existují dále značení kovy, fluorochromy aj.

Základní terminologie imunoanalytiky:

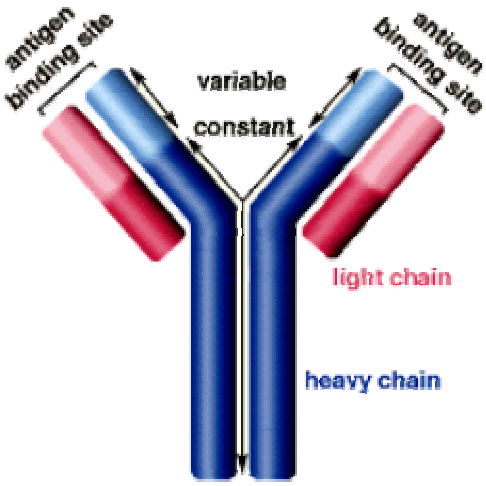
Antigeny – přirozené i umělé makromolekulární látky schopné indukovat v obratlovčím organismu tvorbu protilátek. Vlastnosti antigenů jsou dány jejich stavbou či strukturou, přičemž základní podmínkou splnění antigennosti je molekulová hmotnost ≥ 10 000. jedná se tedy o bílkoviny, peptidy, DNA, polymukosacharidy aj. Za antigeny považujeme i virové částice, těla bakterií, alergeny (pyly, spory), částice prachu aj. Kompletní antigen sestává z:

- makromolekulárního nosiče
- determinanty

Makromolekulární nosič splňuje podmínku molekulové hmotnosti, určuje antigennost. Determinanty jsou molekuly nízkomolekulárních látek nebo případně jejich funkční skupiny (-COOH, -benzyl aj.). Determinanty v komplexu s nosičem určují specifičnost antigenu ve vazbě na protilátku.

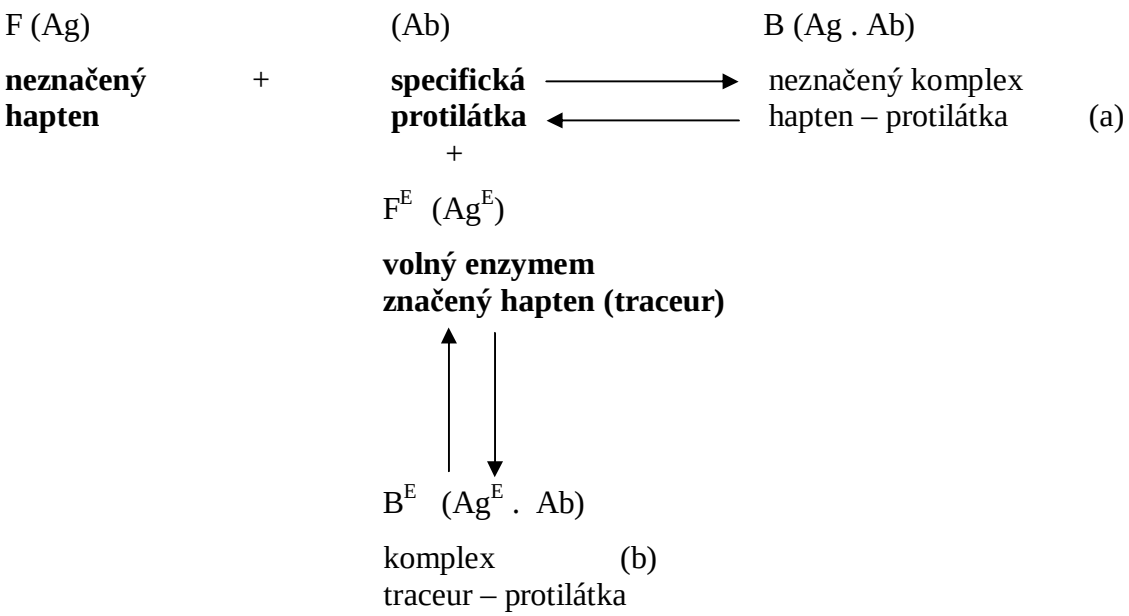
Hapteny jsou nekompletní antigeny. Je-li antigenní determinanta odštěpitelná od nosiče beze změny struktury mluvíme o ní jako o haptenu. Hapteny si zachovávají specifičnost i v izolovaném stavu (tedy reagují s protilátkou, jsou rozpoznány protilátkou, jejíž tvorba byla vyvolána kompletním antigenem). (Poznámka – kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová je haptenem, pro imunizaci zvířat se musí vyvázat na makromolekulární nosič).

Protilátky (imunoglobuliny) jsou bílkoviny krevního séra produkované plazmatickými B-buňkami imunitního systému po aktivaci antigenem. Jejich množství v krvi se zvyšuje při chorobných stavech. Tvoří je 4 peptidické řetězce (2 těžké – H, 2 lehké – L). Jednotlivé řetězce jsou poutány kovalentními disulfidickými můstky. Podle konformace má molekula tvar písmene Y až T (dle rozevření ramen). Variabilní oblasti protilátky nesou paratopy – což jsou rozpoznávací (vazebná) místa pro determinanty antigenu nebo pro hapteny. Sílu vazby protilátky s povrchovou determinantou antigenu charakterizuje tzv. afinita protilátky (vysoká, střední a malá).



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

PRINCIP ELISA A JEJÍ KOMPONENTY



Ke komponentám ELISA analýzy pro stanovení 2,4-D náleží:

- specifická protilátka (monoklonální E_2/G_2)
- volný enzymem značený hapten – traceur (konjugát HRP – 2,4-D)
- hapten o známé koncentraci (standardní 2,4-D)
- neznámá (koncentrace) 2,4-D ve vzorcích

Principem ELISA je kompetice při vazbě haptenu značeného enzymem (traceur) a haptenu nativního na molekulu protilátky (tj. při imunoprecipitaci). Dostatečným množstvím protilátky a dostatečnou reakční dobou je rovnováha reakce (a) posunuta výrazně vpravo. Vazebná schopnost nezreagovaného množství protilátky je po ustavení rovnováhy reakce (a) využita k navázání traceuru reakcí (b). Hodnotu F^E lze kvantitativně vyjádřit aktivitou enzymové reakce nezreagovaného konjugovaného haptenu (traceuru), hodnotu B^E enzymovou aktivitou komplexu traceur – protilátka. Součet F^E a B^E představuje celkovou enzymatickou aktivitu vnesenou do reakce. Za předpokladu konstantního množství protilátky je aktivita traceuru (B^E) tím větší, čím menší bylo množství neznačeného haptenu ve vzorku a naopak. Pomocí standardů lze vyjádřit vztah mezi množstvím neznačeného haptenu v komplexu hapten-protilátka (B) a původním množstvím haptenu ve vzorku (F) kvantitativně, na základě spektrofotometrického měření (měření absorbance produktu enzymatické reakce).

PARAMETRY ELISA

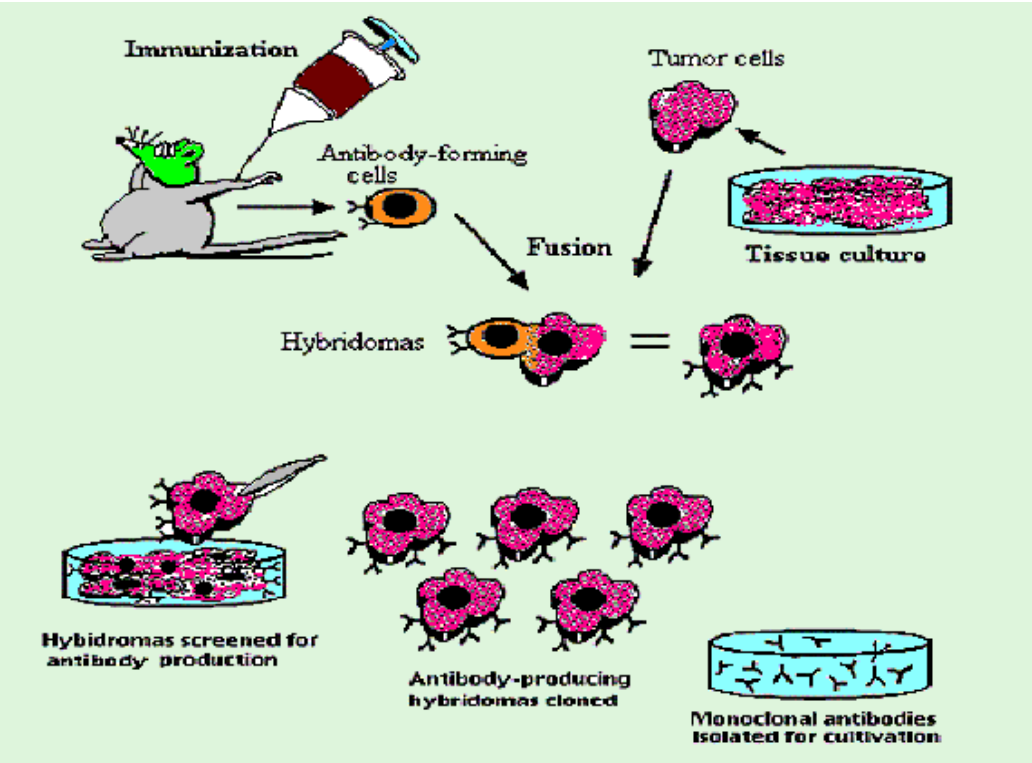
ELISA má parametry spolehlivosti analýzy. Prvním je **vazebnost** (vazebná schopnost, %) - je to podíl absorbance z maximální absorbance vzorku s nulovou

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

koncentrací určované látky. Dále je to **nespecifická vazba** (blank) vyjádřená jako % nespecifické enzymatické aktivity u vzorku bez specifické protilátky (nejnižší hodnota absorbance).

PŘÍPRAVA (VÝROBA) PROTILÁTEK

Protilátky se získávají **imunizací** králíků aj. zvířat, malými dávkami antigenu ve směsi kompletního Freundova adjuvans a to buď intramuskulárně či intradermálně na více míst v různých časových intervalech. Po několika týdnech vytvoří imunizované zvíře dostatek protilátek. Z krevního séra jsou pak izolovány a čištěny tzv. **polyklonální protilátky**. Jejich syntézy se účastní více plazmatických buněk B a kromě syntézy specifické protilátky dochází vždy i k syntéze protilátek pro jiné antigeny. Jiným typem jsou pak **monoklonální protilátky** získávané tzv. hybridomovou technikou (Jerne, Milstein a Köhler 1984 – Nobelova cena). Hybridom je klon somatického hybrida lymfocytu B aktivovaného specifickým antigenem (produkuje pak specifickou protilátku) a maligní buňky myelomu (nádorová buňka z nádoru z kostní dřeně). Myelom přenáší do hybridomu proliferační schopnost, B-lymfocyt přenáší schopnost produkovat specifickou protilátku. Při přípravě se využívá selekce *in vitro* příslušné linie buněk na enzymatickou deficienci a tím pádem se získává klon produkující protilátku specifickou k jedinné antigenní determinantě, se stejně vysokou afinitou všech molekul protilátky a stejnými biologickými vlastnostmi. Protilátka je pak zcela homogenní, v imunometodách nevykazuje křížové reakce. Nejkvalitnější a nejaktivnější protilátky jsou z ascitické tekutiny (ze žaludku).



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

PŘÍPRAVA VZORKŮ 2,4-D Z ROSTLIN

Vzorky pro stanovení 2,4-D z rostlinného materiálu ELISA metodou se extrahují do 90% metanolu. Před extrakcí je vhodné materiál lyofilizovat, lyofilizované uchovávat v exikátoru se silikagelem.

1. Homogenizace materiálu, extrakce

- navážka do 1 g, rozetřít v třecí misce vychlazené tekutým dusíkem; navážka se přelévá 8 ml 90% metanolu, extrakt se vytřepe v erlenmayerově baňce překryté parafilmem po dobu 1 hodiny při teplotě +4 °C

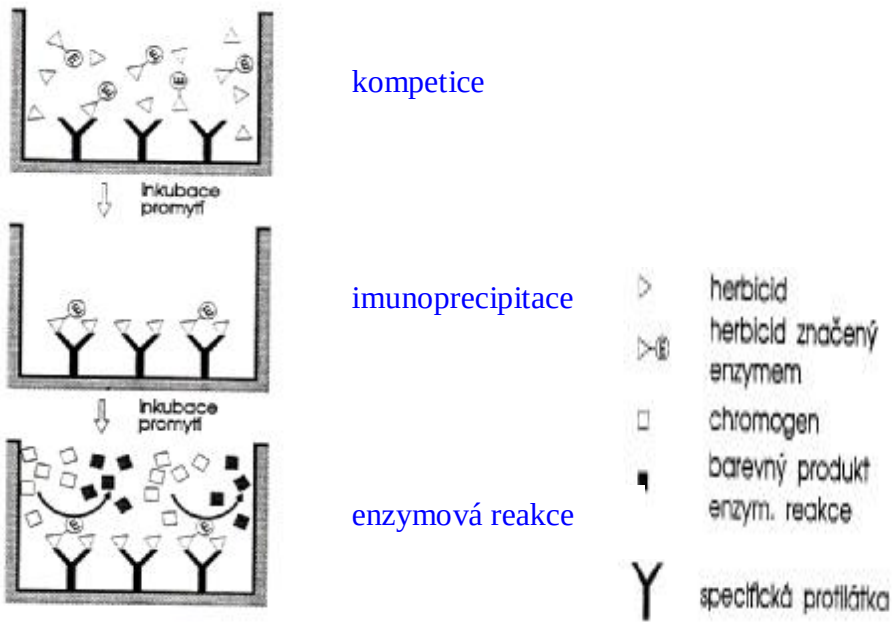
2. Purifikace 2,4-D a příprava pro ELISA stanovení

- extrakt se kvantitativně převede do centrifugačních zkumavek, centrifuguje cca 10 minut a supernatant se nanese na aktivovanou SGX C18 separon kolonu (Sep-pak, velikost částic 60 μm) a nechá se prokapat (tlakem či vakuově) do odpařovací baňky, lipofilní barviva se zachytí na koloně, pro zvýšení výtěžku extrakce je možno sediment po centrifugaci rehomogenizovat a znovu centrifugovat, supernatant (druhý podíl) překapat přes aktivovanou C18 kolonu do odpařovací baňky, spojené supernatanty odpařit na rotační vakuové odparce do sucha, odparek rozpustit v 1 ml destilované vody na ultrazvukové lázni, v případě přítomnosti barviv v takto přečištěném vzorku zamrazit (vhodné nižší teploty) a rozmrazit a znovu centrifugovat, supernatant této centrifugace použít jako finální purifikovaný vzorek

3. Vlastní ELISA

- den předem aktivovat elektronickou finnpipetu Biocontrol, namíchat všechny pufry pro ELISA stanovení, potáhnout mikrotitrační destičku anti-IgG-2,4-D (monoklonální protilátka E_2/G_2), naředit purifikované extrakty (vzorky) destilovanou vodou, v den ELISA testu provést cca 2,5 hod kvantitativní stanovení

Schéma přímé ELISA pro stanovení 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Praktické provedení úlohy

! Celá práce od založení experimentu až po vlastní ELISA stanovení probíhá v několika cvičeních, experiment zpracovává celá studijní skupina. Úloha má seznámit studenty s modernějšími přístupy experimentální a analytické práce ve fyziologii rostlin, včetně syntézy dílčích výsledků. Vlastní ELISA může být v rámci jednoho cvičení provedena pro 4 – 5 skupin studentů.

1. Experimentální záměr a cíl práce

Cílem experimentu je prokázat polární distribuci 2,4-D v explantátech hypokotylů okurky seté po příjmu z kultivačního média *in vitro*. Je možné prokázat transport 2,4-D po krátkodobé indukci tvorby kalusu (20 - 24 hodin kultivace hypokotylárních segmentů na indukčním médiu) na morfologické úrovni a také analýzou obsahu 2,4-D v bazální a apikální části hypokotylárního segmentu. V případě dlouhodobé kultivace explantátu na indukčním médiu s růstovými regulátory se vytváří kalus z celého explantátu (není rozeznatelná polarita explantátu).

2. Zakládání a kultivace explantátů, odběr vzorků

1. Ze sterilně předpěstovaných klíčních rostlin okurek vypreparujeme segmenty hypokotylu v délce cca 3 cm a uložíme na povrch ztuženého indukčního média do kultivační baňky. Označíme apikální a bázální část segmentu (segmenty ukládáme do baněk se stejnou orientací). Připravíme 8 baňek. Po 20 – 24 hodinách kultivace provedeme subkultivaci explantátů ze 4 baněk na médium bez růstových regulátorů a kultivujeme 3 týdny, 3 týdny kultivujeme i zbývající 4 baňky s explantáty na indukčním médiu. Po subkultivaci opět označíme orientaci explantátu. Připravíme několik dalších baněk pro odběry vzorků (upřesní učitel).

Kultivace: indukce kalusu - MS médium + 0,8 mg.l^{-1} 2,4-D + 0,5 mg.l^{-1} BAP + 13,2 mg.l^{-1} Asp, na světle, teplota 25 ^{o}C, po dobu pouze 20 – 24 hodin
růst kalusu – MS médium nebo indukční médium, na světle, teplota 25 ^{o}C, po dobu 3 týdnů

2. V definovaných časech odebereme vzorky – apikální a bazální část hypokotylů (cca 1 cm od konce segmentu, navážky cca 1 g), zaznamenáme a uložíme do označených tub do mrazáku. Při práci zbavíme segmenty zbytků agaru (obsahuje 2,4-D !!!).

Odběry vzorků v časech: - celkem bude pro studijní skupinu připraveno 20 vzorků.

- v průběhu indukce – 2 hod 8 hod 20 hod
- po subkultivaci - 48 hod 72 hod 1 týden
- na indukčním médiu – 48 hod 72 hod 1 týden
- vzorky výchozího materiálu (bez obsahu 2,4-D) – čas 0 hod

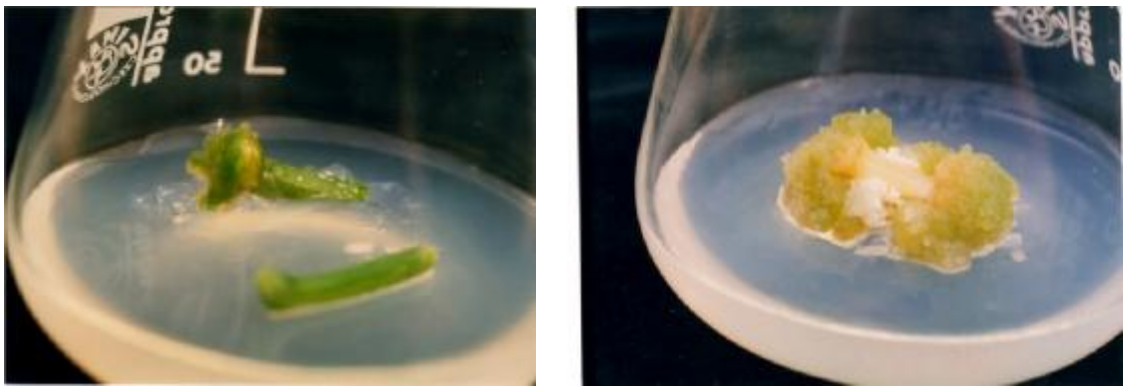
(Poznámka: Složení kultivačních médií a zásady práce ve flow-boxu jsou uvedeny v úloze č. 14)

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

3. Morfologické hodnocení experimentu

Po třech týdnech kultivace zaznamenáme tvorbu kalusu a eventuální polaritu dediferenciace na explantátech (viz obrázek). Vyjádříme frekvenci dediferenciace v %.

Polární tvorba kalusu a úplná dediferenciace explantátu



(Poznámka: Terminologie morfogeneze a dedifernciace je vysvětlena v úloze č. 15)

4. Extrakce a purifikace vzorků

Příprava pro extrakci (připravuje technik):

80% MeOH s BHT (butylhydroxytoluen) 0,1 g/l, metanol redestilovaný (2x destilovaný na rotační vakuové odparce) - uchovávat při - 20 °C
aktivované C18 kolonky aktivace se provádí těsně před použitím v pořadí:
- prokapat 5 ml metanolu
- prokapat 5 ml destilované vody (odstranění solí)
- protáhnout vzduchem do sucha

Čištění kolonek se provádí acetonem (5 ml) a 60% acetonem v dichlormetanu (do sucha).

Postup extrakce a čištění vzorku:

1. Navážku cca 1g čerstvého materiálu resp. lyofilizovaného homogenizovat v 90% metanolu s antioxidantem BHT (butylhydroxytoluen 100 mg.l^{-1}).
2. Homogenát uložit přes noc při - 20 °C.
3. Druhý den třepat homogenát 1 hodinu při + 4 °C v ledničce.
4. Centrifugovat po dobu 20 minut při 6 000 g.
5. Sediment rehomogenizovat v 90% metanolu s antioxidantem, vytřepat a centrifugovat.
6. Spojené supernatanty překapat přes aktivované kolonky SILICA cart C18 (Sep-pak, použití vakuového separátoru).
7. Eluát odpařit na rotační vakuové odparce do sucha.
8. Odparek rozpustit v 1 ml destilované vody v odpařovací baňce na ultrazvukové lázni.
9. Rozpuštěný odparek (1ml) převést kvantitativně do mikrozkumavek a centrifugovat při 3 000 g pro sedimentaci nečistot (zbytky chlorofylu, proteinů).

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

10. Vodný supernatant uskladnit v nových mikrozkumavkách při –20 ^{O}C.

C18 separace je adsorpční chromatografická metoda využívající interakce polárního extrakčního činidla (je mobilní fází) s hydrofobní stacionární fází zachycující molekuly chlorofylů, karotenoidů, řadu látek lipofilní povahy aj. Výtěžek purifikace 2,4-D z rostlinných extraktů pomocí C18 kolonek dosahuje 60 - 70 %.

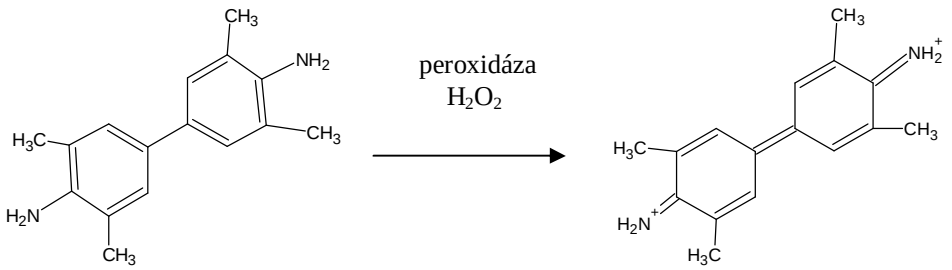
! Je nezbytné dodržovat pokyny učitele při purifikaci – při práci se sklem na rotační vakuové odparce, při sonikaci vzorků ve skle na ultrazvukové lázni (nedotýkat se sklem dna) může dojít k rozbití skla a ztrátě vzorku. Při manuální práci se Sep-pakem (C18 kolony) vyvíjet pouze nepatrný tlak – kolonky jsou segmentované a při větším tlaku se rozpadnou !!!

5. Příprava ELISA stanovení (Fránek et al. 1994)

Příprava roztoků pro ELISA (připravuje technik):

Protilátka E_2/G_2 lyofilizovanou protilátku rozpustit v 0,45 ml dest. vody s 0,02% azidem sodným, skladovat v lednici jako zásobní roztok.
Tracer konjugát 2,4-D-POD skladovat při -20 °C, ředit až před použitím (1:6000 v PBS).
Roztoky
Potahovací roztok - 0,05M uhličitanový pufr, pH 9,6
2,93 g/l $NaHCO_3$ 1,5 g/l Na_2CO_3
PBST - fosfátem pufrovaný fyziologický roztok s Tweenem (1ml Tween 20)
8,5 g/l NaCl, 2,69 g/l Na_2HPO_4, 0,34 g/l KH_2PO_4 (nebo 0,39 g/l NaH_2PO_4)
Substrát - roztok TMB a H_2O_2 v pufru
Na jednu destičku: 10 ml dest. H_2O, 0,5 ml substrátového pufru, temperovat na 37 °C, těsně před použitím přidat 0,1 ml roztoku TMB a 10 µl roztoku H_2O_2
TMB - 0,1g TMB rozpustit v 10 ml DMSO, uchovávat v lednici v temnu, před použitím rozehřát
H_2O_2 - 0,1ml 30% H_2O_2 zředit v 0,5 ml dest. vody (těsně před použitím)
substrátový pufr - 2M octan sodný/kys. citronová, pH 5,8
na 100 ml : 2,72 g octanu sodného rozpustit v 60 ml dest. vody titrovat 1M kys. citronovou (1M=191,2 g/l) pH 5,8 (obvykle 6-11ml), poté doplnit na 100 ml, uchovávat v lednici
1M H_2SO_4 - 5,25 ml konc. H_2SO_4 do 100 ml dest. vody

Schéma enzymatické reakce v ELISA pro stanovení 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny



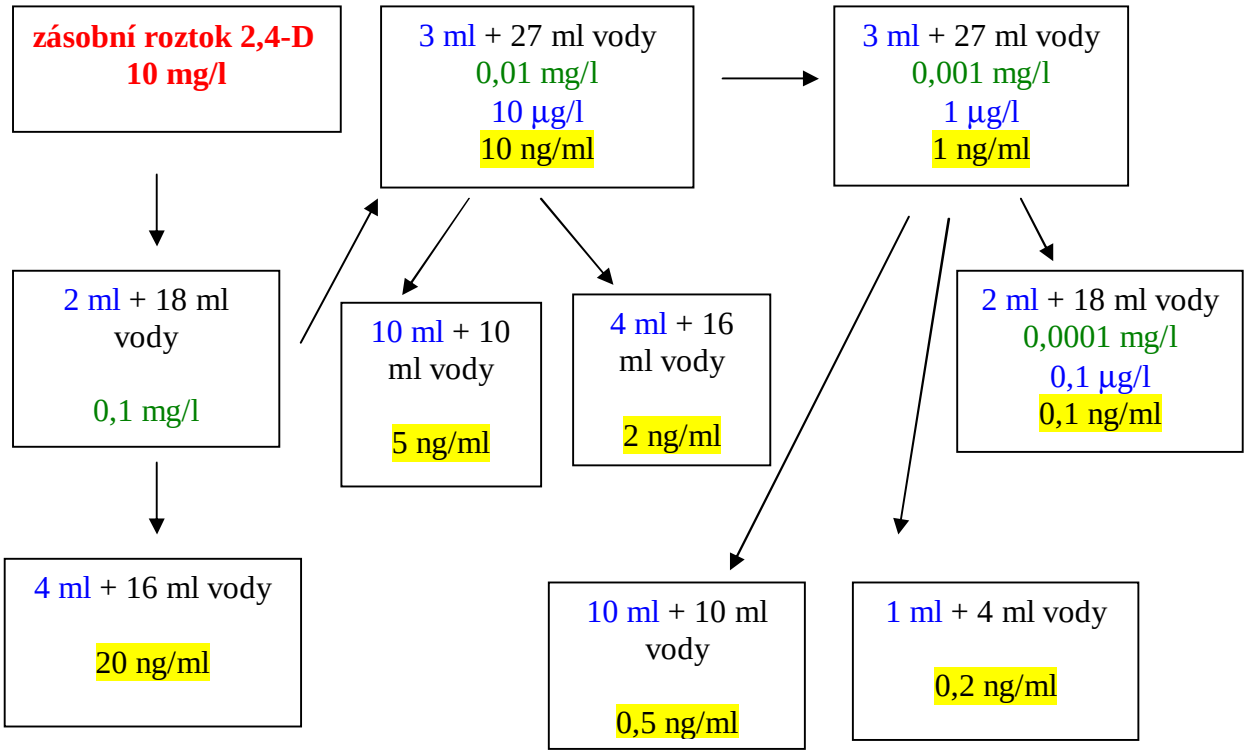
TMB (3,3´,5,5´- tetrametylbenzidine)
chromogen

oxidované TMB
barevný produkt enzymové reakce
je stabilní v kyselém prostředí

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Standardy - příprava a ředění standardů (připravuje technik)

Schéma znázorňuje postup ředění základního roztoku pro přípravu standardů 2,4-D. Zeleně je vypsán obsah 2,4-D na litr příslušného koncentrátu. Ve žlutém poli je koncentrace příslušného standardu v ml na ELISA.



6. Vlastní ELISA stanovení

Vlastní postup:

1. Do jamek mikrotitrační destičky pipetovat 100 µl protilátky (zředěné 1:1000 v 50mM uhličitanovém pufru) vícekanálovou elektronickou pipetou. Uzavřít destičku a inkubovat při laboratorní teplotě přes noc.
2. Destičku vyprázdnit a 3x promýt PBST (ze střičky).
3. Pipetovat 100 µl standardů 2,4-D (doporučený rozsah kalibrace 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ng/ml), a dále 100 µl vzorků (každý vzorek do 4 jamek po 100 µl - extrakt ředěný vodou 1:100), do 6 jamek pipetovat 100 µl dest. vody (maximální vazba), do 6 jamek 150 µl PBST pro blank (jednokanálovými pipetami).
4. Pipetovat 50 µl traceru (konjugát 2,4-D-peroxidáza, ředění 1:6000 v PBST) do všech jamek s výjimkou jamek ponechaných pro blank (vícekanálovou elektronickou pipetou).
5. Inkubovat 1 hodinu při laboratorní teplotě.
6. Destičku vyprázdnit a 3x promýt PBST.
7. Pipetovat do všech jamek 100 µl substrátu (tetrametylbenzidin, vícekanálovou elektronickou pipetou).
8. Inkubovat 15minut.
9. Barevnou reakci zastavit 100 µl 1M H_2SO_4.
10. Změřit absorbanci při 450 nm na ELISA readeru.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Nanášení mikrotitrační destičky pro ELISA na 2,4-D:

Krok č. 3

standardy – triplety – 100 µl – nejvyšší koncentrace 20 ng/ml v řadě A, nejnižší koncentace 0,1 ng/ml v řadě B, dále rostoucí koncentrace 0,2 až 10 ng/ml do řady C až H (mikrotitrační destička má označeny řady a sloupce)

vzorky - triplety, dubly, tetrády 100 µl

blank - 150 µl PBST (bez traceru v bodě 4, tedy bod 4, pro blank neprovádíme)

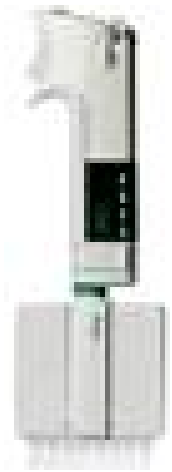
max - 100 µl destilované vody (maximální vazba traceru na protilátku, nejvyšší absorbance)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		20				B2						maximální vazba
B		0,1				B2						
C		0,2				B2						
D		0,5										
E		1										
F		2										
G		5								blank		
H		10										

Potřeba reagencií:

roztok/ počet	1 deska	2 desky	3 desky	4 desky	5 desek
potahovací	10,5 ml	21 ml	31 ml	41 ml	50 ml
E_2/G_2	10,5 µl	21 µl	31 µl	41 µl	50 µl
PBST	5 ml	10 ml	14,5 ml	19,5 ml	24 ml
tracer	1,3 µl	2,4 µl	3,7 µl	4,9 µl	6,1 µl
H_2O	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
substr. pufr	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	2 ml	2,5 ml
TMB	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml
ředěný H_2O_2	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz



Pro vlastní ELISA je nezbytné správně používat digitální pipety a pipetu elektronickou. V průběhu semestru je nezbytné za tímto účelem opakovaně provést nácvik !!! Při dávkování peroxidu vodíku a TMB použít ruukavice. Elektronickou pipetu nepokládat na stůl, odkládat na stojan. Na každý nový vzorek je nutno vyměnit špičku. ELISA desku (vzorky, standardy a traceur) je nezbytné napipetovat v krátké době několika minut vzhledem k okamžitému průběhu imunoprecipitace. Pomalá práce v kroku č. 3 vede k preferenci vazby haptenu na protilátku.

!

!

7. Tabulka na vzorky (navážky) rostlinného materiálu

navážku rostlinného materiálu zapsat do tabulky v „g“ dle zadání úlohy

Výchozí stav (hypokotyly členěné na apikální a bazální část bez kultivace na médiu)				
	apex		báze	
čas „0“	1		2	
Kultivace na indukčním médiu				
2 hodiny	3		4	
8 hodin	5		6	
24 hodin	7		8	
48 hodin	9		10	
72 hodin	11		12	
1 týden	13		14	
Subkultivace na médiu MS (bez růstových regulátorů)				
48 hodin	15		16	
72 hodin	17		18	
1 týden	19		20	

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

8. Výpočet obsahu 2,4-D ve vzorcích v ng.g^{-1} čerstvé hmotnosti:

Výsledky vynásobíme zřeďovacím faktorem a přepočteme na navážku. Při dvojnásobném ředění 1:10 je zřeďovací faktor 100. Například:

finální odparek z cca 1 g materiálu byl rozpuštěn v 1 ml vody ředěn –

I. ředění - 1:10 (tj. 100 µl vzorku + 900 µl destilované vody)
II. ředění – 100 µl I. ředění + 900 µl destilované vody

↘

100 µl II. ředění do jamky mikrotitrační destičky

100 µl v jamce vychází ze sestavení kalibrační křivky v ng/ml (nepřepočítává se)

Zpracování výsledků a vypracování protokolu

V protokolu budou zaznamenány:

- frekvence tvorby kalusu na explantátech,
- navážky vzorků pro analýzu 2,4-D,
- výsledky z ELISA stanovení – kalibrační křivka
- výsledky z ELISA stanovení – přepočty obsahu 2,4-D v explantátech (v jejich částech) na „g“ čerstvé hmotnosti.

Budou zpracovány grafy ve formě histogramu.

Budou uvedena fakta týkající se chyb v čištění vzorků a při vlastní ELISA.
Budou komentovány analyzované výsledky (vztah morfologická reakce a výsledky ELISA) včetně komentáře možných případných chyb.

Jediný protokol vypracuje celá studijní skupina.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz