

Imunoanalytické stanovení zeatin ribosidu (ZR) v rostlinném materiálu

Část I. – Extrakce a purifikace

Úkol: Z rostlinného materiálu izolovat zeatin ribosid pro stanovení metodou ELISA

Při studiu transgenních rostlin, nejrozumnějších fyziologických jevů a procesů a zvláště pak při studiu metabolismu rostlinných hormonů (fytohormonů) je nutno zjistit, v jakém množství se tyto fytohormony v rostlinném organismu (ve vzorku) nacházejí. Činí se tak analytickou procedurou zvanou *stanovení* nebo *kvantifikace*. Ta začíná extrakcí fytohormonu, který je předmětem analýzy (tzv. *analyt*) z rostlinného materiálu do vhodného rozpouštědla. Následuje centrifugace, již se odstraní již nepotřebný pevný materiál (*matrice*) a získaný extrakt fytohormonu se pak dále čistí (*purifikuje*), aby se odstranily tzv. *balastní látky*, které byly ze vzorku extrahovány společně s analytem. Proces stanovení uzavírá tzv. analytická koncovka, tedy metoda, již je přečištěný analyt kvantifikován.

Pro purifikaci se s úspěchem používá celá řada postupů (metod), např.:

- Extrakce v systému dvou kapalných fází (např. voda - ether). Napolární analyt preferuje napolární ether („*Podobné se rozpouští v podobném.*“) a přechází z vodného extraktu do etherické fáze.
- SPE (Solid Phase Extraction), tedy extrakce pevnou fází. Např. analyt, který má napolární charakter, preferuje relativně napolární pevnou fázi před relativně polární kapalnou fází. Přechází tedy z kapalného extraktu na povrch pevného sorbentu, který je obvykle umístěn v kolonce. Po promytí sorbentu (vymytí balastu) se analyt s povrchu sorbentu uvolní aplikací méně polárního rozpouštědla.
- Imunoafinitní extrakce. Roztok analytu se prolije kolonkou obsahující sorbent s navázanou specifickou protilátkou (jde o protilátku specificky interagující pouze s analytem). Po promytí kolony (vymytí balastu) se analyt uvolní reversibilní denaturací protilátky (např. aplikací methanolu) – struktura protilátky se zhroutí, vymizí její schopnost „udržet“ analyt; ten pak odtéká s použitým rozpouštědlem a jímá se.

Coby analytická koncovka se v současnosti používají většinou instrumentální metody. K separaci přečištěného vzorku slouží nejčastěji vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo její modernější obdoba UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). Na ni pak navazuje detekce hmotnostní spektrometrií (MS) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS).

Možná je ovšem kvantifikace pomocí desítky let staré, přesto však dodnes používané metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Princip metody, s níž se lze setkat např. v klinické praxi, je interakce specifických protilátek – sorbovaných na povrchu jamek mikrotitrační desky – s analytem. K vizualizaci se pak používá standard analytu značený enzymem.

V této úloze bude metoda ELISA použita ke stanovení zeatin ribosidu v kalusu *ipt-transgenního tabáku* (*Nicotiana tabacum*). Jeho hladina v tomto materiálu po indukci exprese *ipt* genu je nadprůměrně vysoká. Příprava vzorku bude proto spočívat v pouhé:

- extrakci 70% ethanolem
- centrifugaci (odstraní se pevný, nerozpustný podíl) a
- přečištění extraktu na kolonce s napolárním C8 sorbentem (tj. sorbentem s kovalentně navázanými oktylovými skupinami).

Imunoanalytické stanovení zeatin ribosidu (ZR) v rostlinném materiálu část I.

Pracovní postup:

- 1) navážit asi 1g kalusu ipt-transgenního tabáku, zapsat přesnou navážku
- 2) připravit extrakční činidlo: 5 ml směsi Methanol: H₂O: HCOOH (15:4:1)
- 3) vložit do třecí misky, rozdrtit
- 4) převrstvit kapalným dusíkem, rozetřít
- 5) přidat 100 µL diethyldithiokarbamátu sodného a 2 ml směsi Methanol: H₂O: HCOOH
- 6) směs vpravit do centrifugační zkumavky a třecí misku vypláchnout ještě 1 mL extrakční směsí, centrifugační zkumavky vyvážit, centrifugovat 15 min/15 000 otáček/min.
- 7) C18 kolonu aktivovat 1 ml extrakční směsí
- 8) supernatant nanést na C18 kolonu a nechat prokapat do připravené zkumavky, odpařit do sucha.