

Imunoanalytické stanovení zeatin ribosidu (ZR) v rostlinném materiálu

Část II. – ELISA

Úkol: Stanovit obsah zeatin ribosidu v rostlinném materiálu metodou ELISA

Obsah předchozího cvičení

Z kalusu *ipt*-transgenního tabáku (*Nicotiana tabacum*) byl do 70% ethanolu extrahován cytokinin zeatin ribosid (spolu s ním též další látky, o čemž svědčilo žlutozelené zabarvení extraktu). Po extrakci byl pevný podíl odstraněn centrifugací a supernatant byl přečištěn na kolonce s C8 sorbentem. Přečištěný extrakt byl odpařen k suchu (tj., bylo odpařeno rozpouštědlo – 70% ethanol). V baňce s odparkem je tedy zeatin ribosid, který byl v kalusu obsažen a z kalusu extrahován. Kvantifikace tohoto cytokininu bude provedena metodou ELISA.

Princip

Imunochemická metoda ELISA je založena na použití protilátek specificky reagujících s analytem. Do jamek mikrotitrační desky je nanesen roztok protilátky, která se v průběhu inkubace (při teplotě +4°C) sorbuje na povrch jamek. Po 12 hodinách je roztok protilátky odstraněn a deska je krátce inkubována s roztokem BSA, aby se pokryla ta část povrchu jamek, na niž se protilátka nesorbovala.

Při vlastním provedení ELISA se do jednotlivých jamek vnáší různá známá množství antigenu (tedy standardu) nebo neznámá množství antigenu (jedná se o vzorek). Zároveň se do každé jamky přidává antigen s enzymovou značkou.

Protože antigenu (značeného a neznačeného) je v každé jamce vždy více, než sorbovaná protilátka, kompetuje (soutěží) tyto dva druhy antigenu o dostupnou protilátku. Po hodinové inkubaci je ELISA deska vyprázdněna, promyta a vizualizace navázané enzymové značky je provedena reakcí se substrátem. Kvantifikace je provedena metodou kalibrační křivky, jež vychází ze závislosti absorbance na látkovém množství (neznačeného) standardu.

Provedení analýzy

Odparek v baňce, obsahující zeatin ribosid, je třeba rozpustit a nanést na mikrotitrační desku. Deska je již pro analýzu připravena, tj., na stěnách jejích 96 jamek je nasorbována protilátka proti zeatin ribosidu (ZR). Jamky jsou uspořádány do osmi řad (A-H) a dvanácti sloupců (1-12), schematicky:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	std											0
B	std											B ₀
C	std											B ₀
D	std											B ₀
E	vz											B ₀
F	vz											B ₀
G	vz											B ₀
H	vz											B ₀

Co je nutné si uvědomit:

- V každé jamce je sorbováno stejné množství **protilátky**; v každé jamce bude stejné množství pufru TBS;
- **standard** a **vzorek** bude vnesen do prvního sloupce a následně pipetou ředěn ve směru zleva doprava (tj., koncentrace ve směru doprava bude klesat), až do sloupce 11; ve sloupci 12 bude pouze pufr (TBS);
- do každé jamky kromě A12 se vnese **standard ZR s navázanou alkalickou fosfatasou** (zkráceně označovaný **AP**), do každé jamky stejné množství;
- po navázání standardu, vzorku a AP na protilátku v jamkách (po 60 min) se jamky vyprázdní, promyjí (vše, co je navázáno na protilátku, v jamkách ovšem zůstává) a naplní substrátem (*p*-nitrofenylfosfát).

Enzymová reakce probíhá 60 min. Přeměnou substrátu vzniká žlutý *p*-nitrofenol; jeho zvýšené koncentraci korespondující se zvýšenou přítomností enzymové značky odpovídá zvýšená absorbance, jež je měřena osmikanálovým spektrofotometrem. Je zřejmé, že

- jamky (A-H)1 budou vybarveny **nejméně** – obsahují nejvíce standardu nebo vzorku;
- jamky (B-H)12 budou vybarveny **nejvíce** – obsahují pouze AP;
- jamka A12 nebude vybarvena vůbec – neobsahuje totiž žádný enzym. Tato jamka bude jamkou referentní pro měření absorbance (intensity zbarvení) ostatních jamek (tzv. blank).

Pracovní postup

- 1) Odparek ve zkušavce rozpustit v **25 µl** DMSO a **475 µl** TBS, promíchat.
- 2) Ze zkušavky odebrat do eppendorfky s předloženými **700 µl** TBS **100 µl** roztoku a promíchat.
- 3) Mikrotitrační desku vyklepnout, promýt 2× destilovanou vodou; naplnit jamky pomocí osmikanálové pipety **100 µl** TBS.
- 4) Do jamek A1, B1, C1, D1 vnést po **50 µl** **standardu** ZR (10^{-6} mol/l).
- 5) Do jamek E1, F1, G1, H1 vnést po **50 µl** **vzorku** z eppendorfky.
- 6) Pomocí osmikanálové pipety promíchat sloupec 1, nabrat **50 µl** a přenést do sloupce 2, promíchat, odebrat, ... Postup se opakuje až do **sloupce 11**, z něhož se 50 µl odebere do odpadu. Ve sloupci 12 je tedy čistý TBS (100 µl).
- 7) Do roztoku BSA (18 ml) vnést 20 µl AP (konjugátu standardu ZR s enzymem alkalická fosfatasa). Promíchat opakovací pipetou.
- 8) Opakovací pipetou vnést do každé jamky po **50 µl** roztoku AP. **POZOR!** Do jamky **A12** nepřidávat nic (blank)! Zde bude pouze 100 µl TBS.
- 9) Zaznamenat čas; obsah desky promíchat na třepačce (1-2 min).

Po 60 min

- 10) Desku vyklepnout, promýt 2× destilovanou vodou.
- 11) Osmikanálovou pipetou vnést do každé jamky **150 µl** substrátu (p-nitrofenylfosfát; 1 mg/ml uhličitanového pufru, pH 9,6).

Po dalších 60 min

- 12) Enzymovou reakci zastavit přidavkem **50 µl** NaOH (0,5 mol/l) do každé jamky.
- 13) Změřit absorbanci při 405 nm.

Z naměřených hodnot

spočítat hodnoty relativní absorbance standardu a vzorku (11 quadruplikátů); hodnoty získané pro standard vynést do semilogaritmického grafu (závislost rel. absorbance v % na dekadickém logaritmu látkového množství ZR v **pmol**). Sestrojit kalibrační křivku. Odečíst látkové množství pro vzorek. Spočítat pro vzorek látkové množství ZR vnesené do první jamky (do prvního sloupce) na ELISA-desce. Spočítat celkový obsah ZR ve vzorku. Z navážky vzorku dopočítat výsledek analýzy: obsah zeatin ribosidu v **pmol** (nmol) na **g čerstvé hmoty**.