

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Produkce myšního cytokinu GM-CSF geneticky modifikovanými
rostlinami tabáku**

diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Klára Němečková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomohli při tvorbě této práce. Především děkuji vedoucí své diplomové práce paní Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za její rady a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Lence Langhansové, Ph.D. za odbornou pomoc a vedení v experimentální části mé práce a celému kolektivu laboratoře rostlinných biotechnologií Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Klára Němečková

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Název diplomové práce: Produkce myšího cytokinu GM-CSF geneticky modifikovanými rostlinami tabáku.

Cytokin GM-CSF je v posledních letech využíván hojně v terapii, ale výroba tohoto cytokinu je velmi nákladná. V nedávných studiích byly k získávání biologicky aktivních proteinů, jako např. cytokin GM-CSF, navrženy transgenní rostliny, které by přinesly levnější zdroj těchto látek. Cílem mé práce bylo převést transgenní rostlinu *Nicotiana tabacum* s vneseným genem pro myší GM-CSF na kalusovou kulturu schopnou produkovat tento cytokin. Kalusová kultura je primárním zdrojem pro kultivaci buněčné suspenze, která by mohla být použita ve velkoobjemových kulturách v bioreaktorových systémech k produkci cytokinu mGM-CSF. Vypěstovali jsme v podmínkách *in vitro* několik linií transgenních rostlin *Nicotiana tabacum*, u kterých jsme naměřili a porovnali množství produkovaného mGM-CSF. Nejvyšších naměřených hodnot bylo dosaženo u linie transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* mGM-CSF 23, která obsahovala 3,250 µg myšího cytokinu GM-CSF na 1g čerstvé hmotnosti listu.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Klára Němečková

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Recombinant mouse cytokine GM-CSF produced by transgenic tobacco

A cytokine GM-CSF has been used considerably as a medication recently. However, production of this cytokine is very expensive. Several recent studies suggest transgenic plants as an alternative source of biological active proteins such as cytokine GM-CSF. Transgenic plants could present a low cost source of these proteins. The main goal of this work was cultivation of the tobacco biomass in a form of callus culture able to produce GM-CSF protein. The callus culture is an initial stage for further transformation to suspension cultures suitable for a large-scale cultivation in bioreactor systems. Several lines of transgenic *Nicotiana tabacum* plants cultivated *in vitro* were compared for production of GM-CSF protein. We found the highest concentration of mouse GM-CSF protein in the line 23. The production was 3,250 µg of mouse GM-CSF in 1 g of the fresh leaf.

OBSAH

1	ÚVOD	14
2	TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1	Cytokiny	15
2.1.1	Obecná charakteristika.....	15
2.1.2	Receptory pro cytokiny.....	16
2.1.3	Rozdělení cytokinů	16
2.1.3.1	Interleukiny.....	16
2.1.3.2	Tumor-nekrotizující faktory	17
2.1.3.3	Interferony	17
2.1.3.4	Faktory stimulující kolonie.....	17
2.1.3.5	Chemokiny.....	17
2.1.4	Klinické užití cytokinů.....	18
2.1.4.1	Klinické užití interleukinů	18
2.1.4.2	Klinické užití TNF	19
2.2	Cytokin GM-CSF	19
2.2.1	Struktura.....	19
2.2.2	Zdroje cytokinu GM-CSF	19
2.2.3	Receptory pro cytokin GM-CSF.....	20
2.2.4	Biologická aktivita – funkce cytokinu GM-CSF v organismu	21
2.2.4.1	Makrofág a jeho význam v organismu	21
2.2.4.2	Granulocyt a jeho význam v organismu	21
2.2.5	Klinické využití.....	22
2.2.5.1	Klinické použití a potenciaální význam v medicíně.....	22
2.2.5.2	Dávkování a možné nežádoucí účinky	23
2.3	Biotechnologická produkce proteinů.....	24
2.3.1	Transgenní rostliny	24
2.3.2	Transformace rostlin	25
2.3.2.1	Transformace rostlin pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.3.2.2	Biolistická metoda	25

2.3.3	Význam a využití transgenních rostlin.....	26
2.3.3.1	Konkurenční metody pro získávání látek bílkovinného charakteru.....	27
2.3.3.2	Výhody a nevýhody rostlinného materiálu	27
2.4	Metodika kultivace rostlin <i>in vitro</i>	29
2.4.1	Teoretický úvod do problematiky kultivace rostlin <i>in vitro</i>	29
2.4.2	Kalusové kultury	31
2.4.3	Suspenzní kultury	31
3	CÍL PRÁCE.....	32
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1	Rostlinný materiál a použité chemikálie	33
4.1.1	Rostlinný materiál	33
4.1.1.1	Rostlina <i>Nicotiana tabacum</i> a její transgenní formy.....	33
4.1.1.2	Odběr vzorků a jejich uchování	34
4.1.2	Použité chemikálie	35
4.2	Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	35
4.2.1	Živná média ke kultivaci rostlinného materiálu <i>Nicotiana tabacum</i> a jejich příprava.....	36
4.2.2	Pěstování rostlin	38
4.2.2.1	Klíčivost, ze semen k rostlinám	39
4.2.2.2	Přesazování rostlin	40
4.2.3	Převádění rostlin na kalusové kultury	41
4.3	Metoda SLOT BLOT	42
4.3.1	Charakteristika metody	42
4.3.2	Slot blot rámeček.....	42
4.3.3	Příprava pufrů, roztoků mléka a protilátek.....	44
4.3.3.1	Pufry	44
4.3.3.2	Roztoky mléka	44
4.3.3.3	Protilátky	45
4.3.4	Pracovní postup	45

4.4	ELISA.....	47
4.4.1	Obecná charakteristika detekční metody ELISA.....	47
4.4.2	Příprava Pufřů, roztoků a protilátek.....	49
4.4.2.1	Pufry	49
4.4.2.2	Roztoky.....	50
4.4.2.3	Příprava protilátek	50
4.4.3	Pracovní postup.....	51
5	VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ.....	54
5.1	Výsledky Slot Blot	54
5.1.1	Slot Blot září 2011	54
5.1.2	Slot blot leden 2012	55
5.1.3	Slot blot duben 2012	56
5.2	Výsledky ELISA testu.....	57
5.2.1	ELISA 23. - 24. 4. 2012.....	57
5.2.2	ELISA 26. - 27. 4. 2012.....	58
5.2.3	ELISA 9. - 10. 5. 2012.....	59
5.2.4	ELISA 16. – 17. 5. 2012	59
5.2.5	ELISA 18. – 19. 7. 2012	60
5.3	Kalusové kultury	61
6	DISKUZE	65
7	ZÁVĚR	66
8	POUŽITÉ ZKRATKY	67
9	LITERÁRNÍ ZDROJE	68
10	PŘÍLOHA.....	71

1 ÚVOD

V poslední době se moderní medicína obrací na terapii látkami bílkovinného charakteru, ať už tím myslíme protilátky, cytokiny, vakcíny, růstové faktory nebo další. Problémem těchto látek je velmi drahá výroba. Léčiva tohoto typu pak nejsou dostupná v potřebném množství pro všechny pacienty. Omezené množství a vysoké náklady omezují také experimentální práci s těmito látkami. Nadějí na dostupnější získávání takových látek by mohly být transgenní rostliny, schopné produkovat bílkovinné látky s menšími finančními náklady.

Má práce se týkala převedení transgenní rostliny *Nicotiana tabacum*, v které byl zanesen gen pro myší cytokin GM-CSF, na kalusovou kulturu, která by pak mohla být převedena na suspenzní kulturu. Suspenzní kultura je vhodná pro velkoobjemovou kultivaci v bioreaktoru, a tím pro produkci biomasy jakožto zdroje cytokinu mGM-CSF. Myší cytokin GM-CSF pak může být využíván v experimentálních podmínkách při hledání a potvrzování nových využití této látky.

Během své práce bych ráda poukázala na význam cytokinů obecně a konkrétně na význam cytokinu GM-CSF. Zmíním se i o možném významu a použití transgenních rostlin, které i přes konkurenční metody mohou být v budoucnosti významnými producenty léčivých látek. Dále ve své práci přibližuji metodiku kultivace rostlin *in vitro*.

V experimentální části uvádím možnosti detekčních metod a jejich způsob použití při měření rostlinného materiálu. Mezi tyto metody, které detekují specifický protein a jeho koncentraci, patří Slot Blot metoda a metoda ELISA.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cytokiny

2.1.1 Obecná charakteristika

Cytokiny jsou signální proteiny o molekulové hmotnosti 15-25 kDa, které hrají důležitou roli v imunitní odpovědi organismu. Tyto signální proteiny jsou produkovány buňkami imunitního systému, jako např. T-lymfocyty, makrofágy. K produkci cytokinů dochází i v buňkách jiných než imunitního systému, jako např. v endoteliích a fibroblastech. (Bianchi, Kotlářová 2012)

Název cytokin byl navržen roku 1974 Cohenem, do této doby byly cytokiny označovány na základě jejich účinku (např. chemokiny, interferony, interleukiny) nebo podle typu buněk, které je produkují (např. lymfokiny, monokiny). Dnes již ale víme, že různé buňky mohou produkovat jeden cytokin, a že jeden cytokin může mít několik funkcí. Byl proto navržen pojem cytokin, pod kterým chápeme komplexně všechny proteinové molekuly secernované různými typy buněk. (Bianchi, Kotlářová 2012)

Cytokiny jsou tedy proteinové molekuly s malou molekulovou hmotností, které v lidském organismu zastávají nejrozličnější funkce. Pro buňku představují dodatečné aktivační signály, což znamená, že zaručují mezibuněčnou komunikaci a to jak v rámci imunitního systému, tak mezi imunitním systémem a dalšími soustavami. Funkce cytokinů je rozsáhlá. Některé cytokiny dokážou navodit růst a diferenciaci určitých typů buněk, jiné mají prozánětlivou, ale i protizánětlivou aktivitu a další jsou používány díky jejich antivirotickému působení. Účinek cytokinů je pleiotropní, což znamená, že u různých cílových buněk vyvolávají různou biologickou aktivitu. Jejich vzájemné vztahy jsou velmi složité. Některé cytokiny mají podobný účinek, ne ale vždy se pak dva takové cytokiny v účinku podporují nebo zastupují. Naopak se můžeme setkat i s antagonistickým působením, kdy jeden cytokin inhibuje aktivitu druhého. Mezi hlavní funkce cytokinů můžeme tedy řadit hematopoézu (GM-CSF, G-CSF), imunostimulaci (IL 12) i imunosupresi (IL 10), prozánětlivou (TNF- α) i protizánětlivou funkci a chemotaxi. (Bianchi, Kotlářová 2012, Šefc 2011, Krejsek 2013)

2.1.2 Receptory pro cytokiny

Účinek cytokinů je vázán na jejich reakci s pro ně specifickým receptorem. Receptory pro cytokiny můžeme dělit do několika skupin. První dvě skupiny receptorů fungují na stejném principu, přes tyrosin kinasu. Cytokin se naváže na receptor na povrchu buňky a tím spustí složitou kaskádu dějů, která vede až k expresi specifického genu, který spustí požadovanou reakci. Do první skupiny řadíme cytokiny IL 2, IL 3, IL 4, IL 5, IL 6, IL 7, IL9, IL 13, IL 15, GM-CSF a G-CSF. Do druhé skupiny řadíme interferony. Receptory chemokinů jsou specifické svým spřažením s G-proteinem. A receptory pro TNF nesou svou specifitu v extracelulární části receptoru, která je typická vyšší přítomností cysteinu. (Šefc 2011)

2.1.3 Rozdělení cytokinů

Cytokiny lze rozdělovat dle různých kritérií. Rozdělení, které zde uvádím, je založeno na hlavním účinku cytokinu, jenž u každé skupiny velmi stručně uvádím.

- Interleukiny
- Tumor-nekrotizující faktory
- Interferony
- Faktory stimulující kolonie
- Chemokiny

2.1.3.1 Interleukiny

Název interleukin byl odvozen od leukocytů, které produkují interleukiny v největší míře. Další výzkumy ale odhalily, že interleukiny jsou také produkovány makrofágy, monocyty, endotelem, mastocyty, fibroblasty a dalšími buňkami. Do skupiny interleukinů řadíme glykopeptidové struktury IL-1 až IL-12, IL15, které mají velké využití v dnešní medicíně. Jejich vliv na imunitní systém je velmi rozmanitý, mají prozánětlivé i protizánětlivé účinky, tudíž v rámci jedné skupiny si mohou antagonistovat. Funkcí interleukinů je mnoho, každý z nich má svou specifickou roli, proto je zde konkrétně neuvádím. (Bianchi, Kotlářová 2012, Krejsek 2013)

2.1.3.2 Tumor-nekrotizující faktory

Druhou skupinou cytokinů jsou tumor-nekrotizující faktory, které značíme TNF. Jejich název je odvozen od schopnosti navodit buněčnou smrt nádorových buněk. Nejvýznamnější z této skupiny je TNF- α , který je produkován zejména makrofágy, aktivovanými T-lymfocyty, mastocyty a NK-buňkami. Je jedním z nejdůležitějších prozánětlivých cytokinů, mimo jiné aktivuje koagulaci a stimuluje IL-1 a IL-6. Zde vidíme propojenost cytokinových drah a jejich možnost potenciace. Druhým typem TNF je TNF- β , který má také schopnost navodit u cílové buňky apoptózu. (Bianchi, Kotlářová 2012, Krejsek 2013)

2.1.3.3 Interferony

Interferony mají tři významné zástupce α , β a γ . Interferon α je produkován fibroblasty, makrofágy, T-lymfocyty, monocyty, dendritickými buňkami a NK-buňkami, zatímco interferon γ je produkován převážně T-lymfocyty a B-lymfocyty. Zvýšená syntéza interferonu α je spojena s aktivní virovou infekcí, při buněčném stresu, radiaci, nebo když jsou buňky vystaveny působení endotoxinů. (Bianchi, Kotlářová 2012, Krejsek 2013)

2.1.3.4 Faktory stimulující kolonie

Faktory stimulující kolonie mají vliv na růst a množení určitých buněk imunitního systému. Do této skupiny cytokinů patří G-CSF, M-CSF a GM-CSF. Cytokin G-CSF je faktor stimulující proliferaci a diferenciaci granulocytů. Cytokin M-CSF stimuluje proliferaci a diferenciaci kmenových buněk na makrofágy a jejich diferenciaci na monocyty. A Cytokin GM-CSF ovlivňuje proliferaci a diferenciaci granulocytů i makrofágů. Cytokiny G-CSF a GM-CSF se používají u terapie neutropenií, kde znovuobnovují hematopoetický systém. (Bianchi, Kotlářová 2012, Krejsek 2013)

2.1.3.5 Chemokiny

Funkce chemokinů spočívá v regulaci migrace buněk pomocí chemotaxe, odtud odvozen název chemokiny. Pod pojmem chemotaxe rozumíme pohyb organismu či buňky, který je odpovědí na specifický chemický podnět. (Velký lékařský slovník) Chemokiny se dělí do čtyř strukturně odlišných skupin. Každá skupina pak má schopnost chemotaxe jiných typů leukocytů. (Bianchi, Kotlářová, 2012, Krejsek 2013)

2.1.4 Klinické užití cytokinů

V posledních letech si cytokiny našly svou nenahraditelnou roli v moderní terapii. Některé cytokiny jsou zatím ještě fází klinických testů, ale mnohé z nich již touto cestou prošly a dnes se úspěšně používají k terapii různých onemocnění a poruch. Abych podtrhla význam cytokinů v dnešní terapii, rozhodla jsem se zde několik z nich stručně uvést. Jelikož cytokiny jsou opravdu obsáhlá skupina, vybrala jsem ty, které mají vztah k cytokinu GM-CSF, jenž je pro mou práci stěžejní. (viz. 2.2 Cytokin GM-CSF)

2.1.4.1 Klinické užití interleukinů

Skupina interleukinů je velmi rozsáhlá, uvádím tedy ty interleukiny, které mají určitý vztah k cytokinu GM-CSF. (viz. 2.2 Cytokin GM-CSF)

Jako první uvádím IL 1, který se v organismu vyskytuje ve dvou formách IL-1 α a IL-1 β . Tento interleukin podporuje reaktivitu imunitního systému a je využíván v terapii insomnie, akutních gastritid, při hyperaciditě žaludeční šťávy, u imunodeficientních stavů či u opakovaných virových infekcí. (Bianchi, Kotlářová, 2012)

Další interleukin, který zde uvádím, je IL 2. Tento interleukin je mediátorem specifické imunity (imunita humorální, zprostředkovaná protilátkami). Pod jeho vlivem dochází k proliferaci T-lymfocytů, k stimulaci proliferace a cytotoxické aktivity NK-buněk, k aktivaci specifických protinádorových makrofágů, a k dalším dějům. Díky těmto specifickým vlastnostem je užíván k léčbě revmatoidní artritidy, Sjörgenovy choroby, Diabetu Mellitu 1. typu, a dále při předčasném stárnutí nebo při chronické bolesti. (Bianchi, Kotlářová, 2012)

Posledním interleukinem, který zde uvedu, je významný IL 6. IL 6 indukuje syntézu proteinů akutní fáze, diferenciaci a nárůst počtu B-lymfocytů a T-lymfocytů. Působí synergisticky s IL-1 β a TNF- α . Tento cytokin je nejvíce vyplavován jako odpověď při infekcích, popáleninách, traumatech a tumorech. Své uplatnění našel v terapii jaterní a plicní fibrózy, jako prevence nádorových onemocnění, při imunitní nedostatečnosti, při poškozeních způsobených chemoterapií, v terapii autoimunitní biliární cirhózy a dalších. (Bianchi, Kotlářová, 2012)

2.1.4.2 Klinické užití TNF

Již při rozdělení cytokinů jsem uvedla, že Tumor nekrotizující faktory jsou dva, TNF- α a TNF- β . V této části bych se ráda zmínila o TNF- α , který má velký význam a použití. TNF- α je vytvářen nejen aktivovanými mononukleárními fagocyty, ale i aktivovanými T-lymfocyty, NK-buňkami a mastocyty. TNF- α představuje hlavní spojení mezi imunitním systémem a záněty, a proto je považován za jeden z nejdůležitějších prozánětlivých a imunitu podporujících cytokinů se systémovým účinkem. Používá se především při imunodeficitních stavech, tuberkulóze, virových onemocněních, jako prevence nádorového bujení atd. (Bianchi, Kotlářová, 2012)

2.2 Cytokin GM-CSF

2.2.1 Struktura

Cytokin GM-CSF (faktor stimulující zrání granulocytů a makrofágů) je monomerní protein složený ze 127 aminokyselin. Tento protein je syntetizován ve formě prekurzoru o 144 aminokyselinách, na jehož konci nalezneme hydrofóbní signální sekvenci. Molekulová hmotnost tohoto cytokinu se v závislosti na glykosylaci pohybuje v rozmezí 14-35 kDa. Glykosylace je přirozeným dějem organismu, kdy je na molekulu bílkoviny navázána molekula cukru. Tímto dějem vzniká glykoprotein, který v této formě může mít pozměněné vlastnosti. Některé cytokiny jsou aktivní až v glykosylované formě. (Velký lékařský slovník, 8. vydání) Na rozdíl od jiných cytokinů během *in vitro* testů vykazoval glykosylovaný i neglykosylovaný cytokin stejnou aktivitu. Homologie myšičího a lidského cytokinu se pohybuje okolo 60%. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

2.2.2 Zdroje cytokinu GM-CSF

GM-CSF je organismem produkován při stimulaci imunitního systému patogenem nebo v přítomnosti jiného specifického cytokinu. Nejvíce je produkován T-buňkami a makrofágy, ale i další buněčné struktury tento cytokin produkují, jako např. endoteliální buňky, fibroblasty, NK buňky a mastocyty. Jejich produkce může být indukována

dalšími cytokiny. Endoteliální buňky a fibroblasty mohou být stimulovány TNF- α , TNF- β , IL1 nebo IL2. (Bianchi, Kotlářová, 2012)

Některé buňky jsou schopny produkovat GM-CSF konstantně, tato situace nás však upozorňuje na možnost patologického jevu v organismu. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

Rekombinantní GM-CSF se pro terapeutické použití získává pomocí *Escherichia coli* a kvasinek. (Góra-Sochacka et al., 2010)

2.2.3 Receptory pro cytokin GM-CSF

GM-CSF receptory jsou situovány v různé hustotě, která se pohybuje mezi 100-několik 1000 na jednu buňku, na povrchu myeloidní buňky. Tento fakt je důvodem, proč v dnešní době stoupl zájem o tento cytokin. Cytokin GM-CSF stimuluje kmenové buňky, aby se diferencovaly do granulocytů a monocytů. Tyto receptory najdeme ale i na nehematopoetických buňkách, jako například na endoteliálních buňkách a na malých buňkách karcinomu plic. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

GM-CSF je velká molekula, která je strukturně uzpůsobena k tomu, aby se navázala na receptor skládající se ze dvou částí. Jak jsem již zmínila, receptor se skládá ze dvou podjednotek, přičemž cytokin GM-CSF se váže na receptor, jen pokud obsahuje obě podjednotky. Pokud by cytokin našel jen jednu podjednotku receptoru, nebyl by schopen se pevně navázat a tím ani spustit požadovanou reakci v buňce. Afinita cytokinu k první podjednotce (GM-Ralpha) je nízká a na druhou podjednotku (GM-Rbeta) ani není schopen se navázat. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

Receptor pro GM-CSF má jednu podjednotku menší a druhou větší. Cytokin se vždy nejprve naváže na první podjednotku a až poté vytvoří komplex s receptorem po navázání na podjednotku delší. Právě navázání cytokinu na větší podjednotku způsobí, že se buňka bude diferencovat, dozrávat nebo množit. (*professor Don Metcalf, Walter a Eliza Hall Institute of Medical Research*)

2.2.4 Biologická aktivita – funkce cytokinu GM-CSF v organismu

Cytokin GM-CSF je hematopoetickým růstovým faktorem, a proto je jeho hlavní funkcí v organismu schopnost stimulovat životaschopnost, růst a diferenciaci granulocytů a makrofágů, dále eosinofilů a erytrocytů. Právě proto je tento cytokin významným mediátorem v zánětlivé reakci. Abych vysvětlila jeho význam, přiblížím funkci granulocytů a makrofágů.

2.2.4.1 Makrofág a jeho význam v organismu

Makrofágy jsou jednojadernými buňkami nespecifické imunity. Jejich hlavní funkcí je schopnost fagocytovat - pohlcovat pevné částice cizorodého materiálu z okolního prostředí buňky, např. mrtvé či nemocné buňky, mikroorganismy apod. Strávením pohlcené cizorodé částice, získá makrofág krátké peptidy, které jsou pro tuto částici specifické, a prezentuje je na svém povrchu. Tímto mechanismem, který se nazývá prezentace antigenu, informuje T-lymfocyty o konkrétní cizorodé látce, která pronikla do organismu. Proto má makrofág důležitou funkci v regulaci zánětu, protože bývá první buňkou imunitního systému, která se dostane na místo zánětu a rychle nespecificky reaguje na patogen. Až jako další se dostávají na místo zánětu buňky specifické imunity, které s makrofágy komunikují na principu prezentace antigenu.

Další funkcí makrofágů je produkce cytokinů, destrukce mikroorganismů a odstraňování mrtvých buněk (viz schopnost fagocytózy) a tudíž vzhledem ke všem funkcím, které zastává, i na řízení homeostázy.

Mezi tkáňové makrofágy, patří osteoklasty, mikroglie, Kupfferovy buňky a histiocyty.

2.2.4.2 Granulocyt a jeho význam v organismu

Granulocyt je druh bílých krvinek, který obsahuje ve své cytoplazmě velké množství granul. Dle zbarvení granul (při Wrightově barvení) rozlišujeme tři typy granulocytů: neutrofilů, eosinofilů a bazofilů. Granulocyty hrají podstatnou úlohu při zánětech, v přirozené imunitě, při eliminaci mikroorganismů a odstraňování odumřelých tkání.

Neutrofilly

Jsou buňky imunitního systému, jejichž granula se barví neutrálně - růžově. Tento typ bílých krvinek má největší zastoupení v lidské krvi. Jejich význam je největší v průběhu akutních zánětů, kdy neutrofilly migrují do místa zánětu na základě chemotaxe a fagocytují antigeny proniklé do organismu.

Eosinofily

Eosinofily mají granula, která se barví kysele – červeně. Tyto buňky tvoří 1-6 % cirkulujících leukocytů a v největším zastoupení je nalezneme v kostní dřeni. Dále je nalezneme v thymu, ve vaječnicích, v děloze, slezině, lymfatických uzlinách a u vyústění GITu. Pokud se eosinofily objeví v jiných tkáních či orgánech, signalizuje to patologický stav.

Největší význam eosinofily mají v průběhu parazitárních infekcí. Tyto buňky totiž obsahují ve svých granulech různé chemické mediátory, jako např. peroxidasu, lipasu, Raszu, DNasu, plasminogen a bazické proteiny, které mají právě antiparazitární funkci. Některé tyto mediátory se přichycují na těla parazitů, pro které jsou toxické, a likvidují je.

Bazofily

Jejich granula se barví zásaditě – modře, a představují 0,01-0,3 % cirkulujících leukocytů. Po aktivaci bazofily uvolňují obsah svých granul do okolí (degranulace). Jejich granula obsahují zj. histamin, proteoglykany, proteolytické enzymy, leukotrieny a různé cytokiny. Hrají zásadní roli v zánětlivých procesech a alergických reakcích. Zvýšená hladina těchto leukocytů signalizuje patologický stav, nejčastěji leukémii, lymfom či jiné maligní bujení.

2.2.5 Klinické využití

2.2.5.1 Klinické použití a potenciační význam v medicíně

Rekombinantní lidský cytokin GM-CSF byl poprvé klinicky testován na lidech již v roce 1987 (Neumanitis, 2003). Po tomto testování byl prohlášen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv roku 1991 (FDA, the Food and Drug Administration) za bezpečný lék

k profylaxi neutropenie, navozené po transplantaci kostní dřeně. Další možné využití bylo nalezeno v léčbě akutní neutropenie po léčbě chemoterapeutiky či radioterapií, k léčbě chronické neutropenie a infekcí. Používá se tedy u onemocnění, která jsou charakterizována atypickým zráním krevních buněk, jejich sníženou produkcí či zvýšenou potřebou. Aby se vyhnulo komplikacím, pacienti s myeloblastickým syndromem, akutní myeloidní leukemií nebo autoimunní trombocytopenií musí být při terapii cytokinem GM-CSF pod klinickým monitorováním. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

V dnešní době se cytokin GM-CSF standardně používá k terapii po transplantaci kostní dřeně, kde napomáhá obnovit hematopoetický systém pacienta. Výhoda terapie tímto cytokinem nespočívá jen ve zkrácení období absolutní neutropenie pacienta, ale díky této terapii se i rapidně sníží potřeba podávání intravenózních antibiotik, sníží se možnost infekcí a zkrátí se celková doba hospitalizace pacienta. Další výhodou podávání cytokinu GM-CSF je, že dokáže nejen indukovat diferenciaci buněk, ale také dokáže aktivovat leukemické buňky do přesného stádia buněčného cyklu, v kterém jsou náchylné k dalším typům terapie. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

Díky své důležité roli v imunitním systému je rekombinantní lidský GM-CSF používán nejen k terapii neutropenie a po trasnplantacích kostní dřeně, ale i k terapii aplastické anémie, v terapii rakoviny a AIDS. (Góra-Sochacka et al., 2009)

2.2.5.2 Dávkování a možné nežádoucí účinky

Terapeutická dávka cytokinu GM-CSF je vypočtena na hodnotu 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}$. Cytokiny jsou obecně snášeny lépe v nižších dávkách. Vysoké dávky cytokinů mají srovnatelnou účinnost jako dávky nízké, ale je vyšší riziko nežádoucích účinků. Cytokin GM-CSF může způsobit nežádoucí účinky typu *flu-like syndrom*, který se vyskytuje u 20-30% pacientů a zahrnuje horečku, malátnost, myalgii, vyrážku a možné podráždění v místě vpichu. Některé nežádoucí účinky nejsou přímo způsobeny cytokinem GM-CSF, ale jsou způsobeny indukci sekrece jiných cytokinů cytokinem GM-CSF, např. TNF, IL1 nebo IL6. Terapeutická dávka se aplikuje buď intravenózní, nebo podkožní injekcí. (*GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE*)

Cytokin GM-CSF je již od roku 1991 schválen FDA pod obchodním názvem leukin. (I. Trebichavský, 2013) Jako rekombinantní lidský GM-CSF ho nalezneme pod

generickým názvem Sargramostim, Gramostim, Molgramostim. Tyto látky by měly být generiky. Pro přehled zde uvádím ATC klasifikaci Sargramostimu a Molgramostimu viz Tab. 1, které dle mého hledání nejsou v české republice registrovány. (*Státní ústav pro kontrolu léčiv*)

Tab. 1 ATC klasifikace

ATC level 1	L – Cytostatika a imunomodulační léčiva
ATC level 2	L03 - Imunostimulancia
ATC level 3	L03A – Imunostimulancia
ATC level 4	L03AA – Faktory stimulující kolonie hematopoetických buněk (CSF)
ATC level 5	L03AA03 – Molgramostim L03AA09 - Sargramostim

2.3 Biotechnologická produkce proteinů

2.3.1 Transgenní rostliny

Pod pojmem transgenní rostliny rozumíme rostliny, kterým byla pozměněna genetická informace vnějším zásahem.

První transformace rostlin byly prováděny již v 80. letech dvacátého století. V začátcích modifikace rostlin bylo možné začlenit do genetické informace rostliny pouze jednoduché znaky v malém množství. Byly tak vytvořeny rostliny odolné vůči škůdcům a herbicidům a s postupným vývojem genetického inženýrství byla zlepšena i nutriční hodnota plodin a zvýšila se jejich odolnost vůči nepříznivému klimatu. Díky vysoké produktivitě transgenních rostlin a nižším nákladům bylo do této oblasti značně investováno a technologie v tomto směru pokročila. Dnes je již možné začlenit do genetické informace rostlin mnohem delší úseky cizí DNA a ve větším množství. (Maliga, Graham, 2004)

Původní využití takových rostlin bylo pouze v zemědělství, ale v průběhu vývoje se rozšířilo i do farmacie a medicíny. V dnešní době stoupl zájem o látky bílkovinného charakteru jako terapeuticky významné látky a dle výzkumu posledních let jsou rostliny právě takové látky schopny produkovat. V současnosti se rostlinného materiálu využívá jako zdroje rekombinantních proteinů, kam můžeme řadit savčí protilátky, krevní náhrady, cytokiny nebo vakcíny. (Góra-Sochacka et al., 2009)

2.3.2 Transformace rostlin

Zavedení cizí genetické informace do rostliny, tzv. transformace rostlin, je možná několika způsoby. Dva nejužívanější typy transformace rostlin jsou biolistická metoda a transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, které v další části podrobněji popíši. (*Pracoviště molekulární biologie - Transgenní rostliny*)

Dalšími metodami transformace rostlin jsou např. fyzikální metoda vpravení DNA do buněk, kdy jsou nejdříve buňky zbaveny stěn pomocí enzymové degradace polymerů a následná transformace elektroporací. Poslední metodou, kterou zde uvedu je vnášení DNA pomocí mikroinjekcí, kdy je izolovaná DNA vnesena mikroinjekcí až do jádra protoplastu. (Fusek et. al, 2008)

2.3.2.1 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Tato metoda je použitelná jen u dvouděložných rostlin, protože bakterie *Agrobacterium tumefaciens* tyto rostliny dokáže infikovat a vytvářet v rostlinných pletivech nádory. Část DNA bakterie (Ti-plazmidu) je schopna proniknout do rostlinné buňky a začlenit se do genomu napadené rostliny. Právě této schopnosti se využívá při transformaci rostlin. Ti-plazmid je ta část DNA bakterie, která je přenesena do infikované buňky, a proto se používá pro cílené vnášení konkrétních genů do genomu rostliny. (*Pracoviště molekulární biologie - Transgenní rostliny, Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin*)

Tato metoda vykazuje stabilnější dědičnost transgenů i menší možnost umlčení transgenů než u metody biolistické. (*Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin*)

2.3.2.2 Biolistická metoda

Ne všechny rostliny lze transformovat pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, tato metoda, jak jsem již zmínila, je určena pro rostliny dvouděložné. Ale v oboru zemědělství je velké množství hospodářských rostlin jednoděložných, jako např. kukuřice, pšenice či ječmen. Hledaly se proto nové metody, jak docílit transformace u těchto hospodářsky významných rostlin. V roce 1989 byla připravena první transgenní

rostlina kukuřice pomocí biolisticke transformace. (*Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin*)

Biolistická metoda je založena na nastřelování cizorodé DNA do rostlinné tkáně. Cizorodá DNA se navazuje na povrch kovových částic, velmi často se používají zlaté o průměru kolem 1 μm , které se pak např. pomocí genových děl nastřelují do rostlinných buněk. Některé částice zasáhnou jádro a některým z nich se během regenerace po nastřelování cizorodou DNA podaří začlenit do rostlinného genomu. (*Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin*)

Biolistická metoda vykazuje určité nevýhody. Může totiž dojít k destabilizaci exprese genu a často se můžeme setkat s tím, že během života rostliny dojde k tzv. umlčení genu, nebo se transgen nepřenese na další generaci rostliny. Umlčení genu znamená, že rostlina ztratí schopnosti, které do ní byly uměle vneseny. Ať už to byla odolnost vůči herbicidům nebo produkce bílkovinných látek. (*Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin*)

2.3.3 Význam a využití transgenních rostlin

Transgenní rostliny si velmi rychle našly své uplatnění v zemědělství díky jejich vylepšeným vlastnostem, jako je odolnost vůči škůdcům a pesticidům, zlepšení výživových hodnot zemědělských rostlin, nebo jejich zvýšená odolnost vůči nepříznivému klimatu. Mnohá tato vylepšení dokázala pomoci s nedostatkem potravy v některých chudých zemích.

Význam těchto rostlin si našel rychle své místo i v medicíně a farmacii. Moderní medicína stále více a více využívá k terapii látky bílkovinného charakteru, jejichž získávání je obtížné a finančně náročné. Nedávné studie ukazují, že biologicky aktivní proteiny mohou být produkovány rostlinami, a že produkce rostlinami by mohla být ekonomicky velmi výhodná. Transgenní rostliny mohou produkovat protilátky, lidský sérový albumin, erythropoetin, lidský interleukin 2 a 4 a také myší cytokin GM-CSF. (James et al. 2000)

Význam biologicky aktivních proteinů je v dnešní době veliký. Hrají důležitou roli v diagnostice, prevenci a léčbě různých onemocnění. (Fisher et al. 2004) Jen na 200

protilátek je v současné době ve fázi klinického testování. Mezi choroby, které jsou tímto typem terapie léčeny, patří infekční onemocnění, autoimunitní poruchy, kardiovaskulární choroby, poruchy krvevorbny, neurologické choroby, poruchy respiračního systému, oční choroby, kožní onemocnění a v neposlední řadě rejekce transplantovaných orgánů. (Fisher et al. 2003)

2.3.3.1 Konkurenční metody pro získávání látek bílkovinného charakteru

Transgenní rostliny by mohly zčásti nahradit savčí buněčné kultury, kvasinky nebo transgenní zvířata, která se také používají k získávání biologicky aktivních proteinů a jejich získávání je finančně velmi náročné. Abych ukázala na klady a negativa transgenních rostlin, příkládám další metody získávání biologicky aktivních proteinů.

Kultury savčích buněk jsou hojně používány, protože je zastáván názor, že jejich produkty jsou autentičtější, zvláště pokud jde o glykosylované formy. I přesto ale nalezneme menší rozdíly mezi lidským cukerným řetězcem a hlodavčím. Nevýhody těchto buněčných kultur spočívají nejvíce v drahém vybavení a provozních nákladech. Dále je zde riziko kontaminace rekombinantních látek lidskými patogeny a omezené možnosti na rozšíření buněčných kultur. (Fisher et al. 2003)

Další metodou získávání bílkovinných molekul je produkce bakterií ve velkoobjemových fermentačních systémech. Tato metoda je finančně výhodnější než kultury savčích buněk a je velmi užívána pro produkci Fab úseků, což jsou úseky protilátek, které se vážou na antigen a jsou užívány v detekčních metodách. Výnosy této metody jsou ale často nízké, protože proteiny nejsou produkovány správně. (Fisher et al. 2003)

Nedávným výzkumem je produkce protilátek v mléku transgenních zvířat. Jejich výhoda by pak byla ve vysokých výnosech a opakovaném získávání produktů. Bohužel je tento proces časově velmi náročný a jsou zde i etická pravidla a byrokratické překážky, s kterými se celý proces komplikuje. (Fisher et al. 2003)

2.3.3.2 Výhody a nevýhody rostlinného materiálu

Hlavním výhodou použití rostlin pro produkci proteinů jsou nízké pořizovací náklady i náklady provozní. Mezi finanční výhody patří i možnost, že by pole s transgenními rostlinami mohlo být udržováno a sklízeno neobornými pracovníky.

Dalším pozitivem tohoto typu jsou i malé skladovací prostory, protože rostliny můžeme uchovávat ve formě semen. (Fisher et al. 2003)

Dále je zde minimální riziko kontaminace lidskými patogeny, které hrozí u savčích buněčných kultur.

Určitým problémem by se mohly zdát posttranslační děje, které jsou u rostlin i savčích buněk odlišné. Nalezneme zde menší neshody konečného produktu, jako např. odlišné cukerné řetězce, které jsou typické pro rostliny. Ukázalo se však, že ani cukerný řetězec ani protein (konkrétně rekombinovaný IgG) produkovaný rostlinou nevykazuje imunogenní efekt. (Fisher et al. 2003)

I přes významná pozitiva se setkáváme i s negativy transgenních rostlin. Některé rostliny, vhodné pro transformace, jako např. *Nicotiana tabaccum* či *Nicotiana benthamiana*, obsahují toxické metabolity – alkaloidy. Tyto alkaloidy komplikují situaci při získávání čistého produktu a při jeho použití v experimentálních podmínkách. Vhodným řešením tohoto problému bylo použití variety LA Burley 21, která obsahuje nižší množství alkaloidů. Rostliny tabáku variety LA Burley 21 obsahují pouze 0,2 – 0,5 % alkaloidů v sušině. Touto rostlinou je pak možné bez omezení krmit subjekty výzkumu – laboratorní zvířata, aniž by se prokázaly nežádoucí účinky alkaloidů. (Góra-Sochacka et al. 2009)

Další nevýhodou je transport nebo uchovávání některých rostlinných materiálů. Některý rostlinný materiál vydrží bez úpravy měsíce až roky při pokojové teplotě (*Solanum tuberosum*, obilí), ale jiné musí být skladovány ve formě sušené či zmražené, aby byla zachována aktivita rekombinantních proteinů, což situaci komplikuje a omezuje nejen při skladování ale i během transportu. Největší nevýhodou je pravděpodobně dlouhý vývoj transgenních rostlin a náklady s tím spojené. (Fisher et al. 2003) Období vývoje může trvat i několik let a někdy se během pěstování rostlin může stát, že se transgen umlčí a několik let práce skončí neúspěchem.

Transgenní rostliny mají tedy velké výhody z ekonomického hlediska. A jejich rozšířené použití by pomohlo přinést levnější a dostupnější medikaci pro pacienty, kteří si to dosud nemohli dovolit.

2.4 Metodika kultivace rostlin *in vitro*

2.4.1 Teoretický úvod do problematiky kultivace rostlin *in vitro*

Kultivace rostlin *in vitro* znamená pěstování rostlin v umělém prostředí. Rostliny se kultivují v různých kultivačních nádobách. Dříve se nejvíce pěstovaly ve skleněných nádobách, a proto byla tato kultivace pojmenována „*in vitro*“.

Nekultivují se jen rostliny jako takové, ale i spóry, semena, generativní a vegetativní orgány, pletiva, jednotlivé buňky i buňky, které jsou zbavené buněčných stěn, tzv. protoplasty.

Pro růst a vývoj kultur je důležité prostředí, které jim vytvoříme. Musíme proto zvážit, jaký zvolit typ nádoby, jaké zvolíme kultivační médium, aby měla rostlina dostatek energetických zdrojů, výživy, regulačních látek a vhodné pH. Rostlina je také uměle osvětlována, musíme tedy najít správnou intenzitu a kvalitu světla a zvolit vhodnou fotoperiodu, tedy kolik hodin bude rostlina ve tmě a kolik při světle. Kultivační prostředí musí dále splňovat podmínky stabilní teploty a vlhkosti.

Rostliny jsou pěstovány ve sterilním prostředí, tudíž se nepotkávají s žádnými mikroorganismy. Proto, že rostlina je ve sterilním a zcela umělém prostředí, můžeme nastavit všechny podmínky kultivace a máme možnost tyto podmínky monitorovat a případně upravovat našim potřebám.

Jak jsem se již zmínila v předchozí části, je důležité zvolit správné kultivační médium. Složením média ovlivníme dostupnost a formu živin pro explantát, dále dostupnost vitamínů, vody a růstových regulátorů. Hlavní složkou kultivačního média je voda. Zbývající část média tvoří dvě složky - organická a anorganická. Každá rostlina potřebuje i živiny ve formě iontů. Tyto ionty dělíme na makroelementy (C, Ca, K, N, Mg, P, S) a mikroelementy (Cu, Mo, I, Co, B, Fe, Mn, Zn). (Blažičková 2007) Rostlina, nebo její část, vyžaduje specifické zastoupení iontů pro svůj optimální vývoj a růst. První složení média bylo definováno Murashigem a Skoogem roku 1962 a od této doby médium nese jejich jméno – MS médium. V dnešní době je medií nepřeborná škála s různým složením. Protože rostlina v umělých podmínkách nemusí být schopna syntetizovat některé pro ni esenciální látky, nebo část rostliny, kterou kultivujeme, nemá právě tu část, ve které je látka v celistvé rostlině syntetizována, musíme je

dodávat. Takovou skupinou přidávaných látek jsou vitamíny. Explantátům do médií přidáváme nejčastěji thiamin, pyridoxin a kyselinu listovou. Dalšími přidávanými látkami jsou aminokyseliny, např. glutamin, glycin, nebo látky typu myo-inositol, nukleové kyseliny nebo jejich prekurzory. (Blažíčková 2007)

Nezbytnou složkou kultivačních médií jsou cukry, které slouží jako zdroj uhlíku. Rostliny v *in vitro* podmínkách často nejsou schopny fotosyntetizovat, a proto jim pak musíme zdroj uhlíku dodat. Tímto zdrojem bývají cukry, vždy ale musíme zvolit vhodný sacharid, jeho správnou koncentraci a formu. Nejčastěji je dodávána sacharóza, ale jindy je vhodnější jako energetický zdroj dodat např. maltózu, glukózu či galaktózu. Mezi potřebné sacharidy můžeme zařadit i agar, který je nezbytnou součástí médií. Agar je polysacharid, který rostliny neumí štěpit, zůstane tedy v jejich přítomnosti beze změn. Jeho hlavní funkcí je ztužení médií, v kterém se rostlina snadno uchytí, zakoření a správně zorientuje v prostoru.

Důležitou složkou médií jsou růstové regulátory. Regulátory rostlinného růstu dělíme do několika skupin, ale dvě nejpoužívanější jsou auxiny a cytokininy. V kombinaci se tyto dvě skupiny látek používají k tvorbě kalusů, pak musí být vyvážený poměr těchto dvou skupin. Dále se používají k podpoře růstu prýtlů (cytokininy) nebo růstu kořenů (auxiny). Nejpoužívanější látkou patřící do skupiny auxinů je NAA (kyselina naftyloctová) a 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyoctová kyselina). Mezi růstové regulátory patří také gibereliny, kyselina abscisová a ethylen. (Blažíčková 2007)

Úprava pH média je většinou posledním a velmi důležitým krokem celé přípravy média. Pokud by médium mělo nevhodné pH, rostlina pak není schopná přijímat z něj látky, které jsme do něj pro její potřebu přidali. Optimální pH se pohybuje kolem hodnoty 5,7 až 5,8. Této hodnoty docílíme přidáváním malého množství NaOH či HCl do média za kontroly pH-metrem.

Pokud chceme na médiu selektovat transgenní rostliny od rostlin netransgenních, velmi často se do média přidává kanamycin. Transgenní rostlina má v sobě marker pro rezistenci na kanamycin, a tak rostlina i na médiu s kanamycinem přežije. Na rozdíl od netransgenní rostliny, která zpočátku poroste, ale po nějakém čase začne žloutnout a zahyne.

Pokud se nám příprava média povede a rostlině se v něm daří, začne mezi rostlinou a médiem fungovat výměna látek. Rostlina si potřebné látky z média odebírá a vylučuje do něj látky odpadní, proto bychom po určité době (v našem případě zhruba měsíc) měli rostliny přesadit do nového média.

Jak jsem se již zmínila v předchozí části, rostliny kultivujeme ve sterilním prostředí. Proto musí být kultivační nádobky i s médiem vysterylizovány. Sterilizace zpravidla probíhá v autoklávu.

2.4.2 Kalusové kultury

Kalus je složen z masy volně uspořádaných buněk. Během tvorby kalusu dochází k určité diferenciaci buněk, která většinou vede ke ztrátě schopnosti fotosyntézy. Proto musíme do média pro kalus přidávat potřebné složky, jako jsou vitaminy či zdroj uhlíku. kalusové kultury mohou tedy být bílé, ty které ztratí schopnost fotosyntézy a po málu i zelené, které jsou schopné v určité míře fotosyntetizovat. Bílé kalusy se často kultivují ve tmě, aby nedocházelo k dalším diferenciacím. (Blažíčková 2007)

Tyto kultury mají využití samy o sobě, ale často se používají k založení buněčných suspenzí. (Blažíčková 2007)

2.4.3 Suspenzní kultury

Kalusové kultury mohou být drobné či pevné. Drobné kalusy jsou výchozím materiálem pro buněčné suspenzní kultury. Po přenesení vzorku drobného kalusu do tekutého média a důkladném promíchání se uvolní z kalusu malé shluky buněk. Pokud jsou tyto shluky ve správných podmínkách, pokračují v růstu a dělení a vytvoří buněčnou suspenzní kulturu. V určitých časových intervalech se buněčné kultury ředí. Jak často se ředí a jak moc závisí na typu buněčné suspenze. (Blažíčková 2007)

Pokud je namnoženo dostatečné množství suspenzních kultur, mohou se přenést do bioreaktoru. V bioreaktoru mají suspenzní kultury ideální podmínky pro další růst, ale v bioreaktoru se musí suspenze po určité době ředit novým kultivačním médiem.

3 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo převedení transgenní rostliny *Nicotiana tabacum*, produkující cytokin mGM-CSF, na kalusovou kulturu. Kalusová kultura je výchozím zdrojem materiálu pro převedení na suspenzní kultury do tekutého média. Suspenzní kultury jsou vhodným materiálem k velkoobjemové produkci biomasy, jakožto zdroje mGM-CSF.

Hlavní cíle mé práce můžeme rozdělit do několika bodů:

- Zvládnutí metodiky *in vitro* kultivace rostlin.
- Zvládnutí metody Slot Blot pro rostlinný materiál *Nicotiana tabacum*.
- Optimalizace metody Slot Blot pro daný materiál.
- Zvládnutí ELISA analýzy cytokinu mGM-CSF.
- Převedení transgenní rostliny *Nicotiana tabacum* na kalusovou kulturu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Rostlinný materiál a použité chemikálie

4.1.1 Rostlinný materiál

4.1.1.1 Rostlina *Nicotiana tabacum* a její transgenní formy

Nicotiana tabacum je v českém jazyce tabák virginský, který patří do čeledi *Solanaceae* – lilkovité. *Nicotiana tabacum* v použití jako transgenní rostlina má své výhody i nevýhody. Velkou výhodou představuje fakt, že tabák virginský není určen ke konzumaci lidmi, ani jako krmivo pro zvířata. Je zde tedy minimální možnost kontaminace jídla či krmiv transgenní rostlinou *Nicotiana tabacum*. Další velkou výhodou jsou velké výnosy této rostliny a jeho rychlá schopnost růstu. (Fisher et al., 2004)

Bohužel zde nalezneme i nevýhody, jako například nízkou stabilitu proteinů získávaných z tabáku, nebo přítomnost alkaloidů. Přítomnost alkaloidů v rostlině tabáku je velkým negativem. Alkaloidy totiž musí být kompletně odstraněny, což je proces, který odčerpává další finance a čas. V dnešní době je ale používána rostlina *Nicotiana tabacum* s nízkým obsahem alkaloidů, který činí pouze 0,2 – 0,5% hmotnosti sušeného vzorku. Tato rostlina, která je označována jako N.T. LA Burley 21, byla základem pro transgenní rostliny, které jsme použili právě v mé práci. (Góra-Sochacka et al, 2009)

Transgenní rostliny, které jsou použité v mé práci, byly dodány z polské akademie věd, konkrétně z Ústavu Biochemie a Biofyziky ve Varšavě. V tomto ústavu vytvořili transgenní rostliny N.T. mGM-CSF 23, N.T. mGM-CSF 24, N.T. mGM-CSF 43, N.T. GM-UreB 31, N.T. GM-UreB 17, N.T. Bin 19.

N.T. mGM-CSF 23

Tato rostlina je transgenní verzí N.T. LA Burley 21 s genem murine GM-CSF pod kontrolou promoteru RbcS1. Do rostliny byl zaveden i marker pro rezistenci na kanamycin. Jedná se o matečnou rostlinu.

N.T. mGM-CSF 24

Tato rostlina je transgenní verzí N.T. LA Burley 21 s genem murine GM-CSF pod kontrolou promoteru RbcS1. Do rostliny byl zaveden také marker pro rezistenci na kanamycin. Jedná se o matečnou rostlinu.

N.T. mGM-CSF 43

Transgenní rostlina s genem pro mGM-CSF pod kontrolou promoteru RbcS1 s markerem pro rezistenci na kanamycin. Transformovaná rostlina z původní rostliny N.T. LA Burley 21. Druhá generace rostliny.

N.T. GM-UreB 31 a N.T. GM-Ureb 17

Dvě odlišné transgenní rostliny s markerem pro rezistenci na kanamycin. V obou dvou transformantech je zaveden gen pro GM-CSF a gen pro UreB. U těchto dvou transgenních rostlin nalezneme jiný promotor než u N.T. GM-CSF 23, a to CaMV 35S promotor. Druhá generace rostliny.

N.T. Bin 19

Je transgenní N.T. LA Burley 21 s prázdným vektorem pBin19. Tato rostlina může sloužit ke kontrole pro rezistenci na kanamycin.

N.T. LA Burley 21

Kultivar tabáku, který nebyl geneticky modifikován. Slouží jako kontrola při všech experimentech a měření, tzv. původní kultivar (WT).

4.1.1.2 Odběr vzorků a jejich uchování

Naše transgenní rostliny tabáku jsou závislé s produkcí mGM-CSF na denní či noční době. Jejich nejvyšší koncentrace by měla být kolem osmé hodiny ranní, proto je důležité odebírat vzorky co nejbliže této doby, abychom zaručili co nejvyšší možné množství mGM-CSF.

Odběr vzorků u rostlin musí být takový, abychom rostlinu zcela nezničili a mohli její apikální část přesadit na novou půdu a nechat dál růst. Nejlepší je tedy vybrat období, kdy rostlinky mají být přesazeny. Při odběru vzorků pracujeme ve sterilním prostředí a dodržujeme zásady aseptické práce. Všechny nástroje a laminární box si

vysterilizujeme, ať už pomocí etanolu, nebo pomocí vysoké teploty. Rostlině vždy uřízneme spodní velké listy a bez dotyku s vnějším prostředím je přeneseme do třecí misky s tloučkem. Je dobré mít nástroje pro práci s mraženým vzorkem předchladené. Listy v třecí misce zalijeme tekutým dusíkem a rozdrtíme je na prach, který následně přeneseme do předem vytárované mikrozkuhavky a zvážíme je. Uchovávání vzorků z transgenních rostlin tabáku je možné pouze v mražené formě při -80°C , ostatní typy uchovávání zkracují životnost biologicky aktivních proteinů ve vzorku. Vzorky tedy zamrazíme a v případě potřeby rozmrazíme a použijeme. Není ale dobré vzorek mnohonásobně zamrazovat a rozmrazovat, pak bychom vzorek znehodnotili.

Odběr kalusových kultur je stejný, jen si při odběru musíme dávat pozor, abychom nenabrali spolu s kalusem i kultivační médium a abychom nabrali reprezentativní vzorek. Drcení kalusů v tekutém dusíku je podstatně obtížnější. Je tedy třeba dát pozor, aby nějaká část odebraného vzorku při drcení nevyskočila z misky.

4.1.2 Použité chemikálie

Uvádím zde použité chemikálie včetně výrobců.

- NBT/BCIP Stock Solution (Roche Diagnostics GmbH, U.S.A.)
- Complete – protease inhibitor cocktail tablets (Roche Diagnostics GmbH, U.S.A.)
- Anti-Murine GM-CSF antibody (BioLegend®, U.S.A.)
- Recombinant mouse GM-CSF, carrier free (BioLegend®, U.S.A.)
- Anti-Rabbit IgG (Sigma-Aldrich s.r.o., Praha)
- Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set (Bio-Rad Laboratories, Inc., U.S.A.)
- Bradford Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc., U.S.A.)

4.2 Kultivace rostlin *in vitro*

S metodikou kultivace rostlin *in vitro* jsme se seznámili v Teoretické části. Již tedy víme, že živné médium musí obsahovat specifické látky pro určitý typ rostliny. V následující kapitole uvádím postup přípravy a složení námi použitých médií.

4.2.1 Živná média ke kultivaci rostlinného materiálu *Nicotiana tabacum* a jejich příprava

Jak jsem v obecné části kultivace *in vitro* uvedla, každá rostlina má specifické požadavky na kultivační médium, v kterém je pěstována.

My používali jako základ média pro rostlinky *Nicotiana tabacum* médium Murashigeho a Skoogovo (Murashige a Skoog, 1962), dále jen MS médium. To jsme upravili pro naši kultivaci. V Tab. 2 naleznete zásobní roztoky A, B, C, D, E, F, a dále v ní uvádím konkrétní složení každého zásobního roztoku. Použité vitaminy a aminokyseliny naleznete v Tab. 3. Na konci této kapitoly upřesňuji přípravu –H média s kanamycinem a bez něj, dále média pro kalusy, kam řadíme NK1 médium a 2+K médium.

Tab. 2 Základní MS médium

zásobní roztok	složky	koncentrace g/l	objem zásobního roztoku ml/l	objem zásobního roztoku ml/250 ml
A	NH ₄ NO ₃	82,50	20	5
B	KNO ₃	95,00	20	5
C	H ₃ BO ₃	1,24	5	1,25
	KH ₂ PO ₄	34,00		
	KI	0,166		
	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,05		
	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,005		
D	CaCl ₂ *2H ₂ O	88,00	5	1,25
	CaCl ₂ *6H ₂ O	131,123		
	CaCl ₂ bez vody	66,40		
E	MgSO ₄ *7H ₂ O	74,00	5	1,25
	MnSO ₄ *4H ₂ O	4,46		
	MnSO ₄ *H ₂ O	3,38		
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	1,72		
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,005		
F	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	4,12	10	2,5
	Na ₂ EDTA	3,72		
	FeSO ₄ *7H ₂ O	2,78		

Tab. 3 Vitaminy a aminokyseliny

MS vitamins	složení:		10 ml/l	2,5 ml/ 250 ml
	thiamin (B ₁)	1mg/100ml		

	pyridoxin (B ₆)	5mg/100ml		
	kys. nikotinová	5mg/100ml		
	glycin	20mg/100ml		

POSTUP PŘÍPRAVY pro MS médium

Hlavní složkou média je voda, proto začneme vodou, do které budeme přidávat postupně všechny složky. Připravíme si i menší nádobku na vyplachování pipety, abychom zásobní roztoky vzájemně nemísili. Napipetujeme roztoky A až F (dle tabulky základní MS médium) podle množství média, které chceme připravit. Dále přidáme MS vitamins, což je směs vitaminů a aminokyselin, také v požadovaném množství dle tabulky vitaminy a aminokyseliny. Vždy když máme několik roztoků k pipetování, je dobré si dávat na jednu stranu roztoky již přidané a na stranu druhou roztoky, které teprve budeme přidávat. Zamezíme tím možnosti nepřidání některého roztoku, nebo naopak přidání většího než požadovaného množství. Rostlina by na špatně připraveném médiu mohla i zahynout. Tento roztok zředíme vodou do poloviny požadovaného objemu a přidáme 0,1 g Myo-inositolu a 30 g sacharózy na 1 L roztoku. Sacharóza se bude nějakou dobu rozpouštět, a proto přidáme míchadélko a necháme míchat na magnetové míchače, dokud se sacharóza zcela nerozpustí. Roztok dolijeme v odměrném válci do požadovaného množství, ale necháme malou rezervu, kvůli úpravě pH. Optimální pH pro naše rostlinné kultury se pohybuje mezi 5,7 – 5,8. Roztok, který jsme právě namíchali, má pH většinou kolem hodnoty 5. Budeme muset tedy pH zvýšit pomocí 1 M NaOH. Hodnoty pH se rychle mění, je proto dobré dávkovat NaOH pomocí mikropipety, nejlépe přidávat 20-200 μ l. Po kapkách tedy upravíme pH do požadované hodnoty a ujistíme se, že roztoku je správné množství a případně jej upravíme.

Zde se pracovní postup rozchází podle typu média, které potřebujeme připravit. My jsme jako základ všech médií používali MS médium bez hormonů (-H médium). (Murashige a Skoog, 1962)

Pokud se jedná o médium -H bez kanamycinu (značíme -H), pokračujeme postupem A. Pokud se jedná o médium -H s kanamycinem (značíme -H kan), pokračujeme postupem B. Pokud chceme připravit médium 2+K, pak pokračujeme postupem C a pokud chceme připravit médium NK1, pokračujeme postupem D.

- A) K takto připravenému roztoku v kádince o správném pH, přidáme 7,5 – 8,0 g drceného agaru. Celou směs přivedeme za stálého míchání k varu a vaříme, dokud roztok nezprůhlední. Pak rozlijeme do kultivačních nádobek a vysterilizujeme v autoklávu.
- B) Připravený roztok s upravenou hodnotou pH nalijeme do Erlenmayerovy baňky vhodné velikosti, převrstvíme požadovaným množstvím agaru (viz bod A) a dobře uzavřeme alobalem, pak sterilizujeme v autoklávu. Směs s agarem nemusíme vařit, uvaří se nám v autoklávu. Kádinku po vyklávkování vyndáme a necháme zchladnout. Vychladlou kádinku přeneseme do laminárního boxu a za sterilní práce do ní doplníme kanamycin (0,150 g/L). Kanamycin si rozpustíme maximálně v 10 ml destilované vody, abychom nezměnili média. Připravený roztok kanamycinu aplikujeme do nádoby s médiem pomocí filtračního nástavce na injekční stříkačku. Dobře promícháme a rozléváme do předem vysterilizovaných kultivačních nádob stále za sterilních podmínek v laminárním boxu.
- C) Médium pro kalusy 2+K připravujeme stejně jako médium –H. Rozdíl je jen v přidaném množství sacharózy a některých látkách navíc. My jsme připravovali hned tři typy těchto médií, první bez sacharózy, druhé s 10 g sacharózy na 1 L média a třetí s 30 g sacharózy na 1 L média. Dále se do média navíc přidává 220 µl KIN na 1 L média a 0,23 mg 2,4-D na 1 L média. Médium se pak rovnou vaří s agarem, pokud je bez kanamycinu. Pokud je s kanamycinem postupujeme jako u přípravy média –H kan.
- D) Médium pro kalusy NK1 se také připravuje stejně jako médium 2+K. připravují se také tři varianty s odlišným množstvím sacharózy, ale přidáváme navíc odlišné látky. Do tohoto média přidáváme 10 ml NAA na 1 L média a 300 µl KIN na 1 L média. Dále postupujeme stejně jako u 2+K média.

4.2.2 Pěstování rostlin

Když jsem v dubnu 2011 začínala se svou prací, paní doktorka Langhansová měla již velkou část výzkumu na toto téma za sebou. V té době paní doktorka Langhansová pracovala s rostlinami N.T. mGM-CSF 23 a N.T. mGM-CSF 24. Rostliny byly již vzrostlé a dokonce N.T. mGM-CSF byla převedena na suspenzní kulturu.

V dubnu 2011 přišla semena transgenních rostlin N.T. mGM-CSF 43. Dále byla zaslána semena N.T. Bin19 s prázdným vektorem pro kontrolu, N.T. GM-UreB 31 a N.T. GM-UreB 17 s odlišným promotorem. Všechna transgenní semena byla poslána z Ústavu Biochemie a Biofyziky z Akademie věd ve Varšavě. Spolu se semínky transgenních rostlin přišla i semínka WT (wild type) N.T. LA Burley 21, což byla původní rostlina, z které se transformanty odvozovaly. (Góra-Sochacka et. al, 2009)

4.2.2.1 Klíčivost, ze semen k rostlinám

Semínka jsme tedy museli nejdříve vysít, abychom získali rostliny. Pro různá semena jsme použili různá média. Pro N.T. LA Burley 21 jsme použili MS médium bez kanamycinu. Pro GM-CSF, GM-UreB a Bin 19 linie jsme použili MS médium s kanamycinem. Koncentrace kanamycinu byla 300 mg/1L média. Semínka všech linií jsme navážili do mikrozkupek a pak přepočítali, kolik je v každé linii semínek. Kolik bylo v každé linii semínek a kolik vážily, uvádím v Tab. 4.

Tab. 4 Semena 29. 4. 2011

Kultura	Hm. semen (mg)	Approx. počet semen	Počet semen vysazených	Z toho plovoucích	Počet Petriho misek
GM-CSF 43	14,5	169	189	178	4
GM-UREB 17	17,5	203	241	34	6
LA-BURLEY 21	4,3	50	35	0	2
GM-UREB 31	14,8	172	149	0	3
Bin 19	14,9	173	139	66	3

Než jsme semínka nanесли na agarové půdy vylitých do Petriho misek, museli jsme je odmastit a sterilizovat. Semínka jsme odmašťovali v 70 % etanolu po dobu 1 minuty třepáním. Pak jsme je sterilizovali po dobu 10 minut v 10 % Savu za stálého třepání a nakonec jsme je pětkrát promyli v destilované vodě. Hned během promývání jsme zjistili, že některá semínka plavou a nechtějí se ponořit. Spočítali jsme je a zapsali si tento údaj a vyseli je na oddělené agarové půdy – viz Tab. 4..

Semínka byla velmi drobná a tak jsme je rozstříkovali na agarové půdy pomocí pipety s odříznutou špičkou. Aby tato operace byla lépe proveditelná, nechali jsme semínka v destilované vodě, lépe se pak nabírala.

9. 5. 2011 byla všechna klíčivá semínka už naklíčená. Všechny rostlinky měly přinejmenším dva listy, některým již pučely další lístky. Ještě tento den jsme si připravili - H média s kanamycinem a bez kanamycinu do skleniček, v kterých budeme rostlinky pěstovat.

10. 5. 2011 jsme provedli první selekci, kdy jsme od každé rostliny odebrali do skleniček několik rostlinek. Od N.T. mGM-CSF 43, N.T. GM-UreB 17 a 31 jsme odebrali 10 rostlinek. Od N.T. Bin19 jsme odebrali 8 rostlinek a od N.T. LA Burley 21 jsme odebrali 6 rostlinek.

K 13.5 jsme vyhodnotili klíčivost rostlin. Je zřejmé, že plovoucí semena mají nižší schopnost klíčit. Naše výsledky přikládám v Tab. 5.

Tab. 5 Klíčivost semen 13. 5. 2011

Počet vyklíčených	z toho etiol.	% netransf. z vyklíčených	Celk. % klíčivosti	% zelených (transt.)	% vykl. z plovoucích	% vykl. z neplovoucích	Vykl. z neplovoucích	Kultura
128	23	17,97	67,72	82,03	69,10112	45,45	5	GM-CSF 43
198	13	6,57	82,16	93,43	70,58824	84,06	174	GM-UREB 17
34	0	0,00	97,14	100,00		97,14	34	LA-BURLEY
136	6	4,41	91,28	95,59		91,28	136	GM-UREB 31
120	0	0,00	86,33	100,00	93,93939	79,45	58	Bin 19

Po přesazení rostlinek jsme si prozatím ponechali i ostatní rostlinky, které jsme nechali na původních půdách. Po několika dnech od přesazování jsme upozorovali, že ne všechny rostlinky jsou zelené. Některé byly žluté, což značí, že nebyly transformované, chyběla jim rezistence na kanamycin.

K 31. 5. 2011 byly rostlinky malé a moc nerostly, proto jsme vyseletovali dalších 10 rostlinek od každé linie.

Rostlinky nerostly zpočátku moc rychle, až v září 2011 jsme rostlinky vypěstovali do optimální velikosti. Během přesazování v září jsme odebrali vzorky všech linií a zamrazili je v mrazicím boxu při -80°C.

Každý měsíc jsme pak přesazovali rostliny všech linií, včetně N.T. mGM-CSF 23.

4.2.2.2 Přesazování rostlin

Rostliny jsou pěstovány ve sterilních podmínkách, proto i přesazování musí probíhat za aseptické práce. Přesazování probíhá v laminárním boxu. Veškeré pomůcky k přesazování si předem také vysterilizujeme. Pomůcky, které se používají

k přesazování, jsou zejména pinzety a nůžky. Přesazování probíhá tak, že rostlině ponecháme pouze první dva apikální lístky. Zbytek buď odebereme jako vzorek, nebo je odstraníme. Jeden až dva centimetry pod apikálními lístky rostlinky uřízneme a opatrně pomocí pinzety přeneseme na novou půdu. Rostlina se nesmí mimo inkubační nádobky ničeho dotknout. Takto rostliny přesazujeme vždy alespoň jednou do měsíce, případně častěji dle rychlosti růstu rostlin.

4.2.3 Převádění rostlin na kalusové kultury

Na kalusové kultury jsme se rozhodli převést rostlinu N.T. mGM-CSF 23, u které jsme naměřili nejvyšší hodnoty cytokinu mGM-CSF.

Převedení rostlin na kalusovou kulturu je velmi dlouhý proces. Nejdříve se musí určit, jaká média budou vhodná pro daný kalus. My jsme se rozhodli připravit dva typy média. První médium 2+K s kanamycinem pro mGM-CSF 23 a bez kanamycinu pro LA Burley 21. Druhé médium bylo NK1 a taktéž bylo připraveno s a bez kanamycinu. Oba typy médií jsme připravili ve třech různých variantách v závislosti na koncentraci sacharózy. Kalusy, které jsme odvozovali, měly být zelené. Samy si tedy měly získávat energii pomocí fotosyntézy, a proto jedna varianta média byla bez sacharózy, abychom kalusy donutili fotosyntetizovat. Není ale jednoduché vypěstovat zelený kalus, a proto jsme se rozhodli udělat další dvě varianty média. Jedna s koncentrací 10 g sacharózy na litr média a druhý typ s koncentrací 30 g sacharózy na jeden litr. Dohromady jsme tedy připravili 12 variant médií. Veškerá média a jejich příprava jsou uvedena v kapitole 4.2.1.

Když máme nachystaná specifická média, můžeme přistoupit k samotnému převádění na kalusy. Takto připravená média mají schopnost podporovat v rostlinách tvorbu kalusových kultur. Za aseptických podmínek jsme odebrali listy z rostlin a z každého listu utvořili několik disků. Disk je vykrojený útvar z listu, kde jsou všechny jeho strany oříznuté. List se v rámci zacelení ran brání tím, že začne produkovat nediferencované buňky, které tvoří kalusové kultury.

V září 2012 nám již kalusy narostly. Vzniklé kalusy jsme odebrali a přenesli na nová živná média. Rozhodli jsme se pokračovat na médiích NK1. Protože výsledky z obou médií byly srovnatelné, zvolili jsme médium NK1, ve kterém není obsažen

toxický 2,4-D. Dále jsme kalusy přesazovali až do dubna 2013, kdy jsme odebrali vzorky a kalusy už jsme dál neudržovali.

4.3 Metoda SLOT BLOT

4.3.1 Charakteristika metody

Slot Blot analýza je hojně užívána v molekulární biologii k určení specifického proteinu. Tato metoda neurčuje přesné množství, ale určuje specifickou látku. Množství hledané látky z této analýzy můžeme odhadovat porovnáním se zbarvením standardů.

Tato metoda je založena na principu interakce hledané látky a protilátky. Hledaný protein ve vzorku, pro zjednodušení dále antigen, se naváže na membránu. Po přidání primární protilátky dojde k vytvoření komplexu antigen-primární protilátka. Po přidání sekundární protilátky tedy vznikne komplex antigen-primární protilátka-sekundární protilátka. Sekundární protilátka je specifická protilátka k protilátce primární a většinou je přidávána v komplexu s enzymem, který po přidání substrátu změní barvu. Výsledné zbarvení tedy odpovídá množství hledaného proteinu.

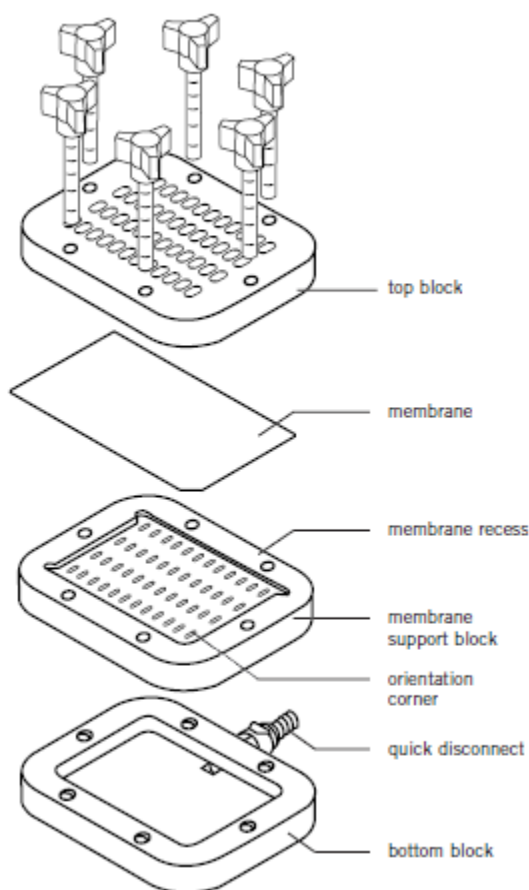
4.3.2 Slot blot rámeček



Obr. 1 Slot Blot rámeček Hoefer PR 648 Slot Blot Blotting Manifold, firma Amersham

Slot Blot metoda používá specifický Slot Blot rámeček, který nám pomáhá zanést do jamky vzorek tak, aby membránou prosákl. Membrána pak zachytí přítomné proteiny a zbylá část vzorku je odsáta. Této metody se využívá proto, že je možné nanést vyšší koncentraci vzorku do jamky, než kdybychom vzorek na membránu nanášeli bez pomoci rámečku. My jsme použili Slot Blot rámeček Hoefer PR 648 Slot Blot Blotting Manifold od firmy Amersham.

Rámeček se skládá z vrchní destičky s jamkami a fixačními šrouby. Dále zde najdeme membránu a filtrační papíry. Obvykle se používají dvě až tři vrstvy filtračních papírů, které oddělují membránu od fixačního rámečku. Prostřední část rámečku je specifická svým orientačním růžkem. Ten slouží k tomu, abychom vždy věděli, kde které vzorky máme a nemohli výsledky zaměnit. Na tuto část se pokládá filtrační papír a membrána. Poslední částí je spodní destička s nástavcem, který slouží k napojení na vakuovou pumpu. Celý systém se k sobě upevňuje pomocí fixačních šroubů.



Obr. 2 Ukázka složení Slot Blot rámečku

4.3.3 Příprava pufrů, roztoků mléka a protilátek

4.3.3.1 Pufry

Solubilizační pufr

Do odměrného válce nalijeme přesně 25 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5-8 a napipetujeme k němu 100 μ l 0,5M EDTA pH 8, jemně promícháme a přidáme 25 μ l β -merkaptoethanolu, celý objem doplníme deionizovanou vodou do objemu 50 ml.

Z tohoto pufru si vytvoříme Solubilizační pufr s inhibitorem, přidáním roztoku 1 tablety Complete. Roztok tablety Complete, si vytvoříme rozpuštěním 1 tablety Complete v 1,5 ml vody. Poté smícháme 1 ml tohoto roztoku s 6 ml solubilizačního pufru.

TBS pufr

24,23 g Tris-HCl a 80,06 g NaCl rozpustíme v 800 ml destilované vody. Poté změříme pH a pomocí HCl ho upravíme na hodnotu pH 7,6. Doplníme vodou do jednoho litru.

TBST pufr

Do TBS pufru se přidá 0,5 ml Tween / 1 litr TBS pufru.

Zásobní detekční pufr

1,576 g 0,1 M Tris-HCl, 0,5944 g 0,1 M NaCl a 1,0165 g 0,05 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ navážíme a rozpustíme v destilované vodě a vodou dolijeme do 100 ml. Čerstvě před použitím přidáme na 1,5 ml zásobního detekčního pufru 30 μ l NBT/BICP viz podkapitola 4.1.2.

4.3.3.2 Roztoky mléka

7 % odtučněného mléka

Roztok mléka připravujeme vždy čerstvý. 7 g odtučněného sušeného mléka rozpustíme v 100 ml TBST pufru.

5 % odtučněného mléka

5 g odtučněného sušeného mléka rozpustíme v 100 ml TBST pufru. Vždy připravujeme roztok čerstvý.

4.3.3.3 Protilátky

Primární protilátka

Do 10 ml 5% odtučněného mléka přidáme zhruba 3,3 μ l anti-mGM-CSF. Množství vždy konkrétně upravíme tak, aby na 20-30 μ g celkového proteinu ve vzorku bylo dávkováno 2-4 μ l primary antibody. Množství celkového proteinu zjistíme pomocí Bradford testu.

Sekundární protilátka

Na 10 ml TBST pufru přidáme 0,33 μ l sekundární protilátky. Sekundární protilátkou je Anti-Rabbit IgG.

4.3.4 Pracovní postup

Tato metoda nám zabere minimálně čtyři hodiny a ještě si musíme vyhradit čas na přípravu vzorků. Všechny použité roztoky, pufrы a detekční protilátky uvádím v předchozí podkapitole 4.3.3.

Nejdříve si připravíme vzorek. Rostlinný materiál rozemeleme v tekutém dusíku na prášek a necháme na ledu. Poté si připravíme solubilizační pufr s inhibítořem. Na 0,01 g mraženého vzorku přidáme 100 μ l solubilizačního pufru s inhibítořem. Dále inkubujeme vzorek v pufru 5 minut na ledu a pak centrifugujeme při 4°C za 15000 otáček 15 až 20 minut. Odebereme supernatant. Pro Slot Blot analýzu odebereme 80 μ l supernatantu, 10 μ l pro stanovení koncentrace proteinů ve vzorku a zbytek zamrazíme na ELISA test.

Koncentraci proteinů musíme stanovit před každým Slot Blot měřením, protože v určité fázi přidáváme detekční protilátky, které dávkujeme dle koncentrace celkového proteinu ve vzorku.

Vzorky pro Slot Blot zahříváme při 95-100°C po dobu 5 minut. Spolu se vzorky zahříváme i pozitivní kontrolu - mGM-CSF z *E.Coli*, který představuje standard. Hned po zahřátí vzorky inkubujeme na ledu po dobu 10 minut. Dalším krokem je nanášení vzorků a standardu na membránu. Na Slot Blot analýzu použijeme nitrocelulózovou membránu (BioRad). Nitrocelulózovou membránu a filtrační papíry zastříhneme přesně na velikost rámečku a namočíme do TBS pufru. Poté je vložíme do rámečku a na chvíli pustíme vakuum, ale jen tak aby membrána nevyschla.

Ještě pod vakuem nanášíme vzorky a standard. Ze vzorků si předem připravíme koncentrační řadu. Na první jamku si přichystáme vzorek následujícím způsobem. Odebereme 80 µl supernatantu a ten zředíme 120 µl solubilizačního pufru. Do druhé jamky si připravíme vzorek tak, že odebereme 100 µl ze vzorku připraveného pro první jamku a zředíme je 100 µl solubilizačního pufru. Z tohoto roztoku odebereme 100 µl a opět zředíme 100 µl solubilizačního pufru. Takto si vytvoříme koncentrační řadu. Vždy si vzorky připravíme předem, abychom je pak už jen nanášeli.

Standard (mGM-CSF z *E.Coli*) připravujeme podobně. Při přípravě 200 µl standardu odebereme 5 µl koncentrovaného standardu (koncentrace 200 µl mGM-CSF/1000µl) a ředíme v 995 µl solubilizačního pufru. Množství vzorku, které nanese na membránu je 100 µl. V těchto 100 µl zředěného standardu pro první jamku je 100 ng mGM-CSF. Z těchto 200 µl takto připraveného prvního ředění standardu pro první jamku, 100 µl odebereme pro nanášení do první jamky pro standard a druhých 100 µl zředíme 100 µl solubilizačního pufru. Dále ředíme stejným způsobem, tvoříme koncentrační řadu. Nanesené vzorky necháme zaschnout.

Pro nanášení na membránu jsme během prvních měření používali 100 µl připraveného vzorku či standardu, ale postupně jsme zvýšili koncentraci, protože jsme během testování zjistili, že původní koncentrace (zejm. standardů) je špatně detekovatelná. Postup je stejný, jen jsme použili vyšší koncentraci. K přípravě standardu jsme tedy použili 10 µl koncentrovaného standardu a 990 µl solubilizačního pufru. 100 µl tohoto standardu pak odpovídá 200 ng. Do první jamky tedy pipetujeme 100 µl tohoto roztoku. Dalších 100µl tohoto roztoku zředíme se 100µl solubilizačního pufru a promícháme. Z tohoto roztoku odebereme 100µl a dáme do druhé jamky. Tvoříme koncentrační řadu, jako v předchozích přípravách. Vzorky na membráně necháme zaschnout.

Membránu vyjmeme ze Slot Blot rámečku a promyjeme v TBS pufru po dobu 5 minut za stálého míchání v inkubační nádobce. Inkubační nádobka by měla být stejně velká jako membrána. TBS pufr opatrně vylijeme a necháme inkubovat membránu v 7 % odtučněném mléku, které jsme si připravili čerstvé. V mléku inkubujeme membránu při 4°C minimálně 1 hodinu, ale můžeme nechat i přes noc. Mléko vylijeme a membránu necháme inkubovat s TBST pufrům po dobu 5 minut za stálého míchání. TBST vylijeme a 1 hodinu inkubujeme s primární protilátkou za stálého míchání. Vylijeme primární protilátku a 10 minut inkubujeme s 5 % odtučněným mlékem za stálého míchání. Vylijeme a třikrát promýváme za stálého míchání po dobu 5 minut v TBST pufru. Vylijeme TBST a inkubujeme membránu 50 minut za stálého míchání se sekundární protilátkou. Po této inkubaci vylijeme sekundární protilátku a dvakrát promyjeme v TBST pufru po dobu 5 minut za stálého míchání. Poté TBST pufr vylijeme a dvakrát promyjeme v TBS pufru po dobu 5 minut za stálého míchání. TBS pufr vylijeme a opatrně vyndáme membránu z inkubační nádobky. Membránu položíme na sklo, zalijeme 1,5ml detekčního pufru NBT/BICP a necháme inkubovat 10 až 20 minut ve tmě, dokud se neobjeví bandy. Reakci zastavíme, až když je zabarvení skvrn zřetelné, zalitím membrány vodou. Membránu vyndáme z vody a necháme uschnout.

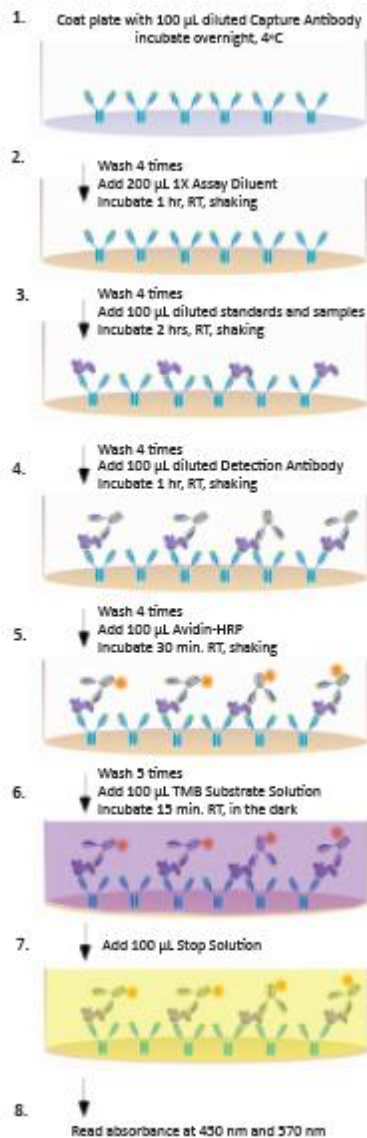
4.4 ELISA

4.4.1 Obecná charakteristika detekční metody ELISA

ELISA je zkratka anglického názvu Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Je nejužívanější metodou ke kvalitativnímu i kvantitativnímu určení protilátek. Je tedy možné detekovat specifickou látku a určit její množství. Princip metody ELISA je založen na specifické interakci antigenu a protilátky. Na jedné z těchto látek je kovalentně navázán enzym, nejčastěji peroxidasa, který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu. Substrát je do reakční směsi přidáván, protože chemickou reakcí je přeměněn na barevný produkt. Tento produkt je pak stanovován spektrofotometricky nebo na základě fluorescence. Koncentrace barevného produktu je pak přímo úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku. ELISA není jen jednou metodou, těchto metod je hned několik typů, avšak všechny mají společné, že antigen nebo protilátka je

Assay Procedure Summary



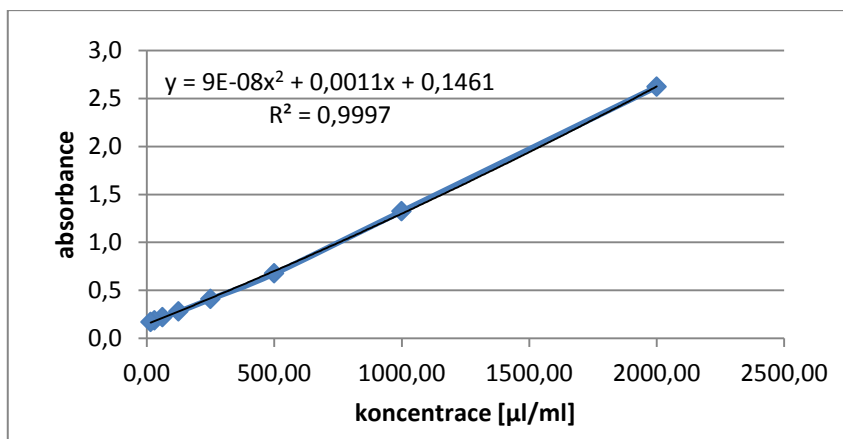
Obr. 3 Princip ELISA metody

absorbance a známých koncentrací si vytvoříme kalibrační přímku, z které pak vypočítáme koncentrace vzorků. Pro upřesnění viz Obr. 4.

zakotvena na nerozpustný nosič. Nosičem je často přímo povrch reakční nádoby či mikrotitrační destičky, což nám velmi usnadňuje separaci navázaných molekul. My použili tzv. sendvičový typ, kdy je na nerozpustný nosič navázána specifická protilátka, na kterou se naváže antigen, v našem případě to byl GM-CSF. V následujícím kroku se na naši látku naváže další protilátka a vytvoří se tzv. sendvič. Vše je velmi dobře vidět na příloženém Obr. 3. Sendvič představuje komplex protilátka – antigen (GM-CSF) – protilátka. Pak se k tomuto komplexu přidá enzym a substrát, jak jsem již zmínila, které vytvoří barevný produkt úměrný koncentraci antigenu (GM-CSF). V našem případě byl prvním antigenem mouse GM-CSF specifická monoklonální protilátka, detekční protilátku tvořil anti-mouse GM-CSF. Substrátem byl TMB Substrate Solution a jako peroxidasa byla použita Avidin-horseradish peroxidasa (Avidin-HRP) viz Obr. 14.

Měření přítomného proteinu ve vzorku se stanovuje pomocí absorbancí standardního roztoku.

Ze standardu si vytvoříme koncentrační řadu o přesných koncentracích. Z naměřených hodnot



Obr. 4 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorku

4.4.2 Příprava Pufců, roztoků a protilátek

4.4.2.1 Pufry

Solubilizační pufr

Do odměrného válce nalijeme přesně 25 ml 1 M Tris HCl pH 7,5-8 a napipetujeme k němu 100 µl 0,5 M EDTA pH 8, jemně promícháme a přidáme 25 µl β-merkapt ethanolu, celý objem doplníme deionizovanou vodou do objemu 50 ml. Takto připravený roztok můžeme skladovat při 4°C.

PBS pufr

Do kádinky nalijeme alespoň půl litru destilované vody a přidáme: 8,0 g NaCl, 1,16 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl, a doplníme deionizovanou vodou do jednoho litru. pH nastavíme na 7,4.

Mycí pufr (Wash Buffer)

Do 1 L PBS pufru přidáme 50 µl Tweenu. pH 7,4 je už nastavené v PBS pufru, a proto ho už nemusíme nijak upravovat.

4.4.2.2 Roztoky

Standard Mouse GM-CSF

Do lahvičky, v které máme 24 ng Mouse GM-CSF, přidáme 200 µl Assay diluentu. Z tohoto roztoku odebereme 16,7 µl a zředíme v 983,3 µl PBS pufru. Tím získáme 2000x ředění, což odpovídá koncentraci Mouse GM-CSF 2000 pg/1 ml viz Obr. 14.

Roztok s inhibítorem

1 tableta Complete se rozpustí v 1,5ml vody. Do 6ml solubilizačního pufru přidáme 1ml roztoku tablety rozpuštěné v destilované vodě.

Ředěný Avidin-HRP

Avidin-HRP zředíme v PBS pufru v následujících množstvích, 12 µl Avidin-HRP a 11,99 ml PBS pufru viz Obr. 14.

TMB Substrate Solution

U tohoto roztoku je velmi důležité, aby byl připraven těsně před použitím. Příprava je velmi jednoduchá. Smícháme 6ml Substrate Solution A a 6ml Substrate Solution B promícháme a rychle aplikujeme do jamek mikrotitrační destičky viz Obr. 14.

Stop Solution

5,359 ml 1 M H₂SO₄ doplníme deionizovanou vodou do 100ml.

4.4.2.3 Příprava protilátek

Capture Antibody

Nejdříve si připravíme Coating Bufferu, který lze připravit z 2,4ml Coating Bufferu a 9,6ml deionizované vody. Poté smícháme 60 µl Capture Antibody a přidáme k němu 11,94ml zředěného Coating Bufferu viz Obr. 14.

Detekční protilátka

Nejprve zředíme Assay Diluent. Vezmeme 2,8ml Assay Diluent a přidáme 11,2ml PBS pufru. Poté vezmeme 11,2ml tohoto roztoku přidáme do něj 60 µl Detection Antibody viz Obr. 14.

4.4.3 Pracovní postup

Pro naše měření jsme použili ELISA MAX Deluxe Sets, Mouse GM-CSF, od firmy BioLegend, Inc. V Příloze přikládám originál pracovního postupu od této firmy na Obr. 13 a Obr. 14.

ELISA je časově náročný test, je na něj třeba vyhradit alespoň dva dny.

Všechny použité roztoky, pufrы a protilátky uvádím i s přípravou v předchozí kapitole 4.4.2.

První den

První den odebereme vzorky. *Nicotiana tabacum* je citlivý rostlinný materiál, abychom zachovali aktivitu přítomných proteinů, vzorky ihned po odebrání homogenizujeme v tekutém dusíku, zvážíme a zamrazíme při teplotě -80°C . Ke vzorku přidáme čerstvě připravený solubilizační pufr s inhibítorem, na 0,01 g zmrazeného vzorku přidáme 100 μl pufru s inhibítorem, a celou směs důkladně promícháme míchadélkem v mikrozkuhavce, abychom všechny vzorek ze stěn ponořili do pufru s inhibítorem. Poté 5 minut inkubujeme na ledu. Během inkubace vzorků na ledu si nastavíme centrifugu a necháme ji vychladit na 4°C . Po inkubaci vzorky přeneseme do centrifugy, rozmístíme je tak, aby byla vyvážená a při 4°C po dobu 15 minut centrifugujeme při 15000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci vzorky opatrně vyjmeme, aby nám zůstaly oddělené vrstvy, a odebereme supernatant. Ze supernatantu si odebereme 10 μl na stanovení koncentrace proteinů a zbylý supernatant skladujeme v mrazícím zařízení při -20°C , abychom ho druhý den mohli použít na ELISA test.

Během prvního dne musíme nechat inkubovat jamky mikrotitrační destičky se specifickou protilátkou GM-CSF, která se pevně navazuje na materiál, tzv. Capture Antibody. Do každé jamky dáme 100 μl připraveného Capture Antibody a inkubujeme 16 až 18 hodin při 4°C . Během této doby se nám protilátka pevně naváže v jamkách k materiálu destičky, aby se nám pak GM-CSF, který přidáme ke vzorku, na ně mohl navázat.

První den je dobré udělat ještě test Bradfordové, stanoví koncentraci bílkovin v materiálu. Podle koncentrace proteinu ve vzorku víme, kolik vzorku dát do jedné jamky, abychom byli schopni naměřit reprezentativní výsledky ELISA analýzy.

Druhý den

Je důležité všechny reagenty přemístit do místa s pokojovou teplotou, aby se nám dopředu vytemperovaly.

ELISA destičku vyndáme z chladicího zařízení, kde se během noci inkubovala a čtyřikrát ji promyjeme mycím pufrem. Po každém promytí destičku pokud možno vždy stejným způsobem vylijeme a poklepeme na filtračním papíru, abychom dosucha odstranili tekutinu z jamek. Poté do každé jamky napipetujeme 200 μ l PBS pufru a 1 hodinu inkubujeme za stálého třepání. Během inkubace destičky si připravíme vzorky k nanášení do jamek. Vzorky se ředí 10 000x. Dále si připravíme standard, který zředíme 2000x.

Po inkubování destičky s PBS pufrem pufr vyklepneme. Dále destičku čtyřikrát promyjeme mycím pufrem a po každém promytí vyklepneme. V tuto chvíli začneme nanášet vzorky. Pro lepší vysvětlení přikládám Tab. 6, kde bílá plocha představuje počet jamek na destičce. Do řady A budeme nanášet vzorky, standardy a WT kontrolu (WT = Wild type). Do každé jamky v řadě dáme 200 μ l vzorku či standardu. Do řad B až H napipetujeme 100 μ l PBS pufru. Následně ředíme tak, že nabere pipetou 100 μ l z řady A, a napipetujeme je do řady B, zde důkladně vzniklý roztok promícháme. Nejlépe se míchá několikanásobným natažením a vypuštěním objemu pipety. Poté nabere 100 μ l z řady B a přeneseme je do řady C, znovu několikrát promícháme a stejným způsobem pokračujeme až k řadě H, kde po promíchání nabere 100 μ l a vyhodíme je. Ještě než začneme ředit všechny jamky, musíme si určit, kde uděláme negativní kontrolu (dále jen NK). Negativní kontrola je představována jen PBS pufrem, musíme tedy dát pozor při ředění, abychom zvolené jamky nechali jen s PBS pufrem.

Tab. 6 ELISA test – možné rozvržení destičky

A	STD	STD	VZ1	VZ1	VZ2	VZ2	VZ3	VZ3	VZ4	VZ4	WT	WT
B												
C												
D												

E												
F												
G											NK	NK
H											NK	NK

Když máme destičku takto připravenou, můžeme přistoupit k dalšímu kroku, což je inkubace po dobu 2 hodin s třepáním při pokojové teplotě. Pokud konkrétně neuvádíme jinou teplotu, je ELISA analýza prováděna až na pár kroků, při pokojové teplotě. Po dvouhodinové inkubaci vyklepneme roztok z jamek a čtyřikrát promyjeme mycím pufrem. Připravíme si roztok s detekční protilátkou a do každé jamky napipetujeme 100 μ l tohoto roztoku. Tato druhá protilátka nám vytvoří tzv. sendvič: protilátka-GM-CSF-protilátka. Inkubujeme hodinu se stálým třepáním. Poté obsah v jamkách vylijeme a čtyřikrát promyjeme mycím pufrem. Během hodinové inkubace si zředíme Avidin-HRP, dle instrukcí v návodu. Po promytí pipetujeme 100 μ l zředěného roztoku Avidin-HRP do všech jamek a 30 minut inkubujeme za stálého třepání. Následuje vyklepnutí destičky a pět promytí mycím pufrem. Abychom co nejlépe vyčistili destičku od předchozího materiálu, je dobré, aby každé promytí trvalo 30 až 60 vteřin. Pak přidáme 100 μ l čerstvě připraveného TMB Substrate Solution viz Obr. 14, který nám v konečném kroku zajistí modré zbarvení úměrné ke koncentraci GM-CSF ve vzorku. Po patnácti minutách inkubace ve tmě destičku vytáhneme a tentokrát nevyklepáváme obsah jamek, místo toho do nich přidáme po 100 μ l Stop Solution. Pozitivní reakci vidíme hned po přidání Stop Solution, kdy by se nám obsah jamek měl přebarvit z modré na žlutou. Po tomto konečném kroku do třiceti minut změříme absorbanci při vlnové délce 450 nm a 570 nm. Vlnovou délku 450 nm použijeme pro měření vzorku a jako referenční vlnovou délku použijeme 570 nm.

5 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

5.1 Výsledky Slot Blot

5.1.1 Slot Blot září 2011

V září 2011 jsme měřili první Slot blot, který byl zkušební verzí. Koncentrační řada standardu byla 100 až 1,56 ng. 5 µl koncentrovaného standardu jsme tedy ředili v 995 µl solubilizačního pufru. Jelikož byl test jen zkušební, neměřili jsme ani Bradford test a tak jsme použili jen 3,3 µl primární protilátky do 10 ml 5 % odtučněného mléka. Pro měření jsme použili nitroceluloseovou membránu. Výsledek měření přikládám na Obr. 5.



Obr. 5 Slot Blot analýza září 2011

V první řadě vidíme nedenaturovaný standard, v druhé řadě standard denaturovaný. Třetí řada zobrazuje nedenaturovaný vzorek N.T. GM-CSF 23 a čtvrtá řada stejný vzorek, ale denaturovaný.

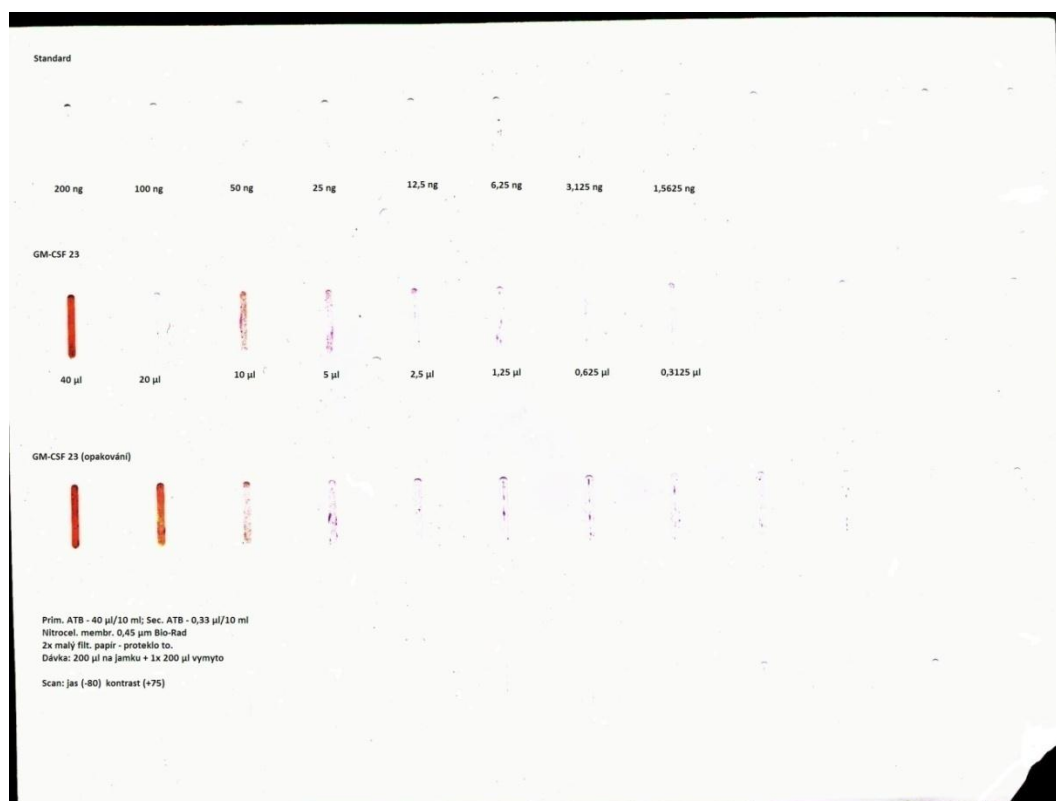
Z výsledků jsme usoudili, že příští měření provedeme s vyšší koncentrací standardu, který byl téměř nedetekovatelný a že lepších výsledků dosahujeme u denaturovaných vzorků.

5.1.2 Slot blot leden 2012

V lednu 2012 jsme měřili Slot blot analýzu vzorků N.T. GM-CSF 23. Membrána, kterou jsme použili, byla nitrocelulózová z Bio-radu (0,45 μ m, Cat. No.:162-0167). Po předchozím měření bylo do každé jamky nanášeno 200 μ l, abychom výsledné zbarvení lépe viděli. Koncentrační řada standardu začínala na dvojnásobku minulého měření, tedy na 200 ng v první jamce.

Změřili jsme Bradford test a hodnota celkových proteinů ve vzorku byla 3 μ g/ 1 μ l.

Dle výsledků Bradford analýzy jsme přidali primární protilátky do 10 ml 5 % odtučněného mléka 40 μ l. Ve Slot Blotu bylo použito celkem 480 μ g celkového proteinu ve vzorku, který byl rozdělen do dvou řad po devíti jamkách. Výsledek našeho měření přikládám na Obr. 6.



Obr. 6 Slot Blot analýza leden 2012

Z výsledného Slot Blotu je zřejmé, že v našem vzorku je přítomen cytokin mGM-CSF.

5.1.3 Slot blot duben 2012

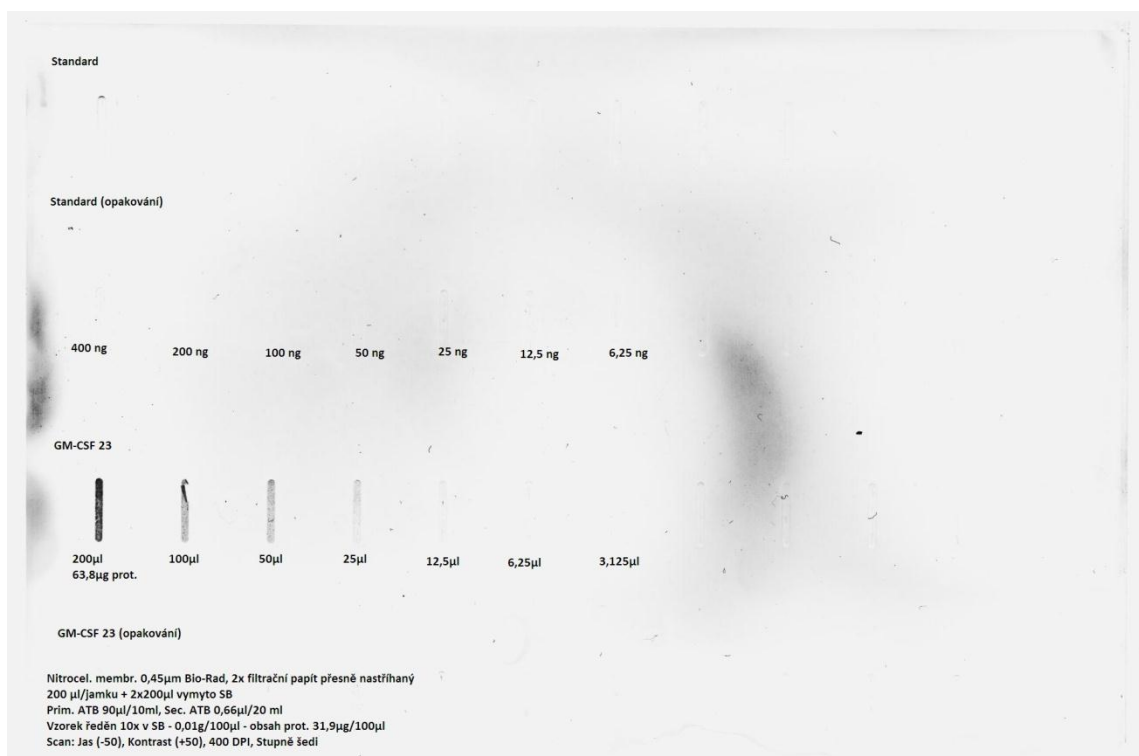
Na Slot blot jsme použili nitrocelulosovou membránu. Použili jsme čerstvě odebraný vzorek N.T. GM-CSF 23.

Odebrané vzorky jsme analyzovaly pomocí Bradford analýzy. Dle měření jsme zjistili, že celkový obsah proteinu ve vzorku je 0,319 mg/ ml. Primární protilátky bylo tedy přidáno do 10 ml 5 % odtučněného mléka 90 µl.

Do každé jamky bylo naneseno 200µl pro zřetelnější detekci. Koncentrační řada standardu začínala na dvojnásobku prvního měření a do jamky bylo pipetováno 200µl,

tedy 400ng v první jamce a pak koncentrační řada jako v předchozích měřeních. Výsledky měření uvádím v Obr. 7.

Z výsledného Slot Blotu vyplývá, že ve vzorku N.T. mGM-CSF 23 je přítomen cytokin mGM-CSF.



Obr. 7 Slot Blot analýza duben 2012

5.2 Výsledky ELISA testu

K měření výsledků jsme použili čtečku mikroděstiček TECAN Infinite 200, od firmy Schoeller v kombinaci se softwarem Tecan i-Control verze 1.4 od firmy Tecan Group Ltd. Switzerland.

5.2.1 ELISA 23. - 24. 4. 2012

Testované vzorky byly *Nicotiana tabaccum* (dále jen N.T.) mGM-CSF 43, N.T. La Burley 21 a N.T. Bin 19. Transgenní rostlinu představuje N.T. mGM-CSF 43, N.T. Pro

všechna měření jsme používali jako negativní kontrolu PBS pufr, La Burley 21 představuje Wild Type a Bin 19 N.T. je rostlina s prázdným vektorem, obě dvě poslední rostliny slouží také ke kontrole. Ředění vzorků bylo 10 000x.

V příložené Tab. 7 uvádím výsledky z našich měření. Ve druhém sloupci nalezneme množství vzorku z odebraných listů, ve třetím sloupci obsah celkových proteinů ve vzorku ředěném 10x. Ve čtvrtém sloupci najdeme množství mGM-CSF ve vzorku pro Elisa analýzu, v pátém sloupci relativní statistickou odchylku a v posledním sloupci vypočítané množství mGM-CSF v μg na 1g odebraného vzorku.

Tab. 7 výsledky ELISA analýzy 24. 4. 2012

vzorek	množství vzorku (g)	celk. proteiny (mg/ml)	mGM-CSF v ředěném vzorku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (%)	mGM-CSF $\mu\text{g}/\text{g}$
43/1	0,2223	2,70	0,2054	16,14	2,054
43/2	0,3337	1,90	0,1082	6,54	1,082
43/3	0,1889	1,60	0,1403	5,65	1,403
43/4	0,2701	3,10	0,2568	18,79	2,568
43/5	0,2873	2,76	0,1801	22,14	1,801
21/1	0,0416	2,67	0	---	0
21/2	0,051	2,71	0	---	0
19/1	0,1382	2,57	0	---	0

Z výsledků vyplývá, že všechny vzorky obsahovaly detekovatelné množství cytokinu mGM-CSF. Nejvyšší množství bylo naměřeno u rostliny N.T. mGM-CSF 43/4.

5.2.2 ELISA 26. - 27. 4. 2012

Zjišťovali jsme množství mGM-CSF v N.T. GM-UREB 17, N.T. La Burley 21 a N.T. Bin 19. Transgenní rostlinu představuje N.T. GM-UREB 17.

Zředění vzorků bylo stejné jako při prvním měření, což bylo 10 000X. Standard byl ředěn 2000X.

Tab. 8 Výsledky ELISA analýzy 27. 4. 2012

vzorek	množství vzorku (g)	celk. proteiny (mg/ml)	mGM-CSF v ředěném vzorku ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD (%)	mGM-CSF $\mu\text{g}/\text{g}$
17/1	0,1913	2,25	0	---	0
17/2	0,1974	1,98	0	---	0
17/3	0,1107	2,89	0	---	0
17/4	0,1850	2,08	0	---	0

17/5	0,1838	2,37	0	---	0
21/3	1,3015	2,00	0	---	0
19/2	0,3283	2,18	0	---	0

Pro tyto vzorky je koncentrace proteinu k testování nízká – množství mGM-CSF je nedetekovatelné. Proto bylo nutné při dalším měření vzorky méně ředit. V Tab. 8 uvádím hodnoty odebraných vzorků a celkové množství proteinu ve vzorcích.

5.2.3 ELISA 9. - 10. 5. 2012

Vzorky jsme zředili 10 000x. Testovanou transgenní rostlinou byla N.T. GM-UreB 31.

Tab. 9 Výsledky ELISA analýzy 10. 5. 2012

vzorek	množství vzorku (g)	celk. proteiny (mg/ml)	mGM-CSF v ředěném vzorku (µg/ml)	RSD (%)	mGM-CSF µg/g
31/1	0,2228	2,07	0	---	0
31/2	0,3717	2,28	0,0654	22,08	0,654
31/3	0,2979	2,63	0,0014	25,84	0,014
31/4	0,4033	2,33	0,0243	35,41	0,243
31/5	0,2830	2,85	0,0039	17,99	0,039
21/4	0,2538	1,91	0	---	0
19/3	0,2094	2,61	0	---	0

Koncentraci mGM-CSF jsme neměřili ve všech vzorcích. Koncentraci mGM-CSF nebylo možné spočítat ze získaných hodnot u vzorku N.T. GM-UreB 31/1. Ostatní získané hodnoty uvádím v Tab. 9. Naměřené množství mGM-CSF bylo ve vzorcích nízké, proto jsme při dalším měření u rostlin N.T. GM-UreB zvýšili koncentraci.

5.2.4 ELISA 16. – 17. 5. 2012

V tomto měření jsme se rozhodli namíchat vzorky několika typů transgenních N.T. Měřili jsme obsah mGM-CSF v transgenních rostlinách N.T. mGM-CSF 24, N.T. mGM-CSF 23, N.T. GM-UREB 17, N.T. GM-UREB 31, N.T. mGM-CSF 43. Jako negativní kontrolu jsme použili PBS pufr a jako WT jsme použili N.T. la Burley 21 a pro kontrolu jako rostlinu s prázdným vektorem N.T. Bin 19. Zředění vzorků bylo 1000x.

Tab. 10 Výsledky ELISA analýzy 17. 5. 2012

vzorek	množství vzorku (g)	celk. proteiny (mg/ml)	mGM-CSF v ředěném vzorku (µg/ml)	RSD (%)	mGM-CSF µg/g
24	0,1741	3,29	0,3480	5,94	3,480
23	0,2125	3,71	0,3250	7,95	3,250
43/6	0,3024	2,21	0,1636	4,26	1,636
17/6	0,2142	2,42	0,0040	40,03	0,040
31/6	0,3266	2,14	0,0078	32,15	0,078
19/4	0,2746	2,87	0	---	0
21/4	0,2538	1,91	0	---	0

Výsledky byly detekovatelné viz Tab. 10. Získali jsme pozitivní výsledky u vzorků z transgenních rostlin N.T. mGM-CSF 23, N.T. mGM-CSF 24 a N.T. mGM-CSF 43. V posledním testu je již nemusíme měřit.

5.2.5 ELISA 18. – 19. 7. 2012

Pro tento test jsme vybrali N.T. mGM-CSF 43, dále N.T. GM-UREB 17 a N.T. GM-UREB 31. Dle předchozích výsledků jsme se rozhodli zředit vzorky pouze 100X, abychom dosáhli měřitelných hodnot.

Jak jsme předpokládali, obsah mGM-CSF byl v rostlinách N.T. GM-UreB 17 a N.T. GM-UreB 31 nízký. Díky menšímu naředění, jsme získali detekovatelné hodnoty. Veškeré naměřené výsledky přikládám v Tab. 11.

Tab. 11 Výsledky ELISA analýzy 19. 7. 2012

vzorek	množství vzorku (g)	celk. proteiny (mg/ml)	mGM-CSF v ředěném vzorku (µg/ml)	RSD (%)	mGM-CSF µg/g
43/3	0,3870	2,57	0,2566	23,54	2,566
43/5	0,2980	3,47	0,1598	10,78	1,598
17/1	0,3274	2,81	0,0036	33,83	0,036
17/2	0,4627	2,85	0,0050	20,60	0,050
17/3	0,4992	2,55	0,0047	15,52	0,047
17/6	0,3985	2,76	0,0031	12,68	0,031
31/2	0,2586	3,52	0,0078	9,83	0,078
31/5	0,3963	3,14	0,0070	8,59	0,070
31/6	0,2965	2,97	0,0089	15,04	0,089
21/4	0,2538	1,91	0	---	0
19/4	0,2746	2,87	0	---	0

5.3 Kalusové kultury

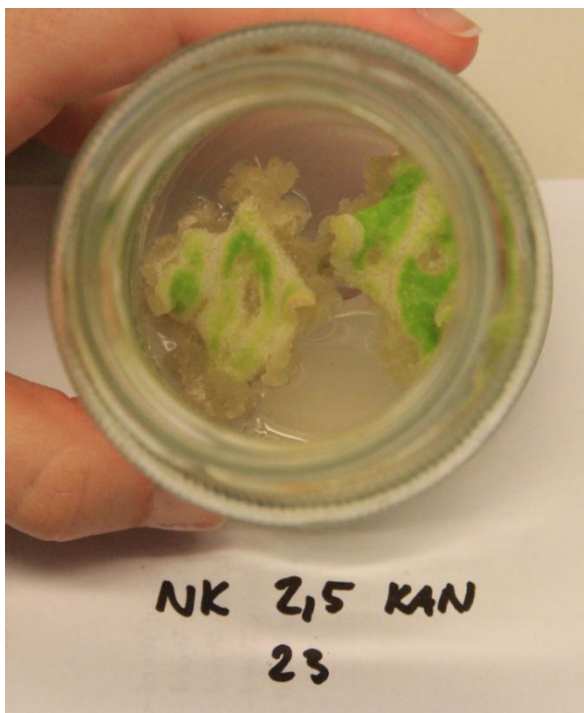
V kapitole 4.2.3 jsem popisovala, jak se převádí kalusové kultury. V této kapitole bych ráda ukázala výsledky své práce. Kalusy se nám podařilo vypěstovat na všech médiích, jen na médiu bez sacharózy se to nepodařilo, protože narostly jen bílé kalusy, které nejsou schopny fotosyntézy. Na přiložených obrázcích ukazují, jak se na kterém médiu kalusy vytvořili. Obr. 8 ukazuje disk rostliny N.T. mGM-CSF 23 na NK1 médiu bez sacharózy, zde kalus nenarostl. Na Obr. 9 můžeme vidět kalus, který narostl po okrajích disku na médiu NK1 s koncentrací 10 g sacharózy na 1L média. Na Obr. 10 vidíme narostlý kalus na médiu NK1 s koncentrací sacharózy 30 g na 1L média.

Obě dvě média, NK1 i 2+K, jsou vhodná pro pěstování kalusů odvozených z rostliny N.T. mGM-CSF 23. Na Obr. 10 a Obr. 11 je ukázáno, že kalusy rostly dobře jak na médiu NK1, tak na médiu 2+K.

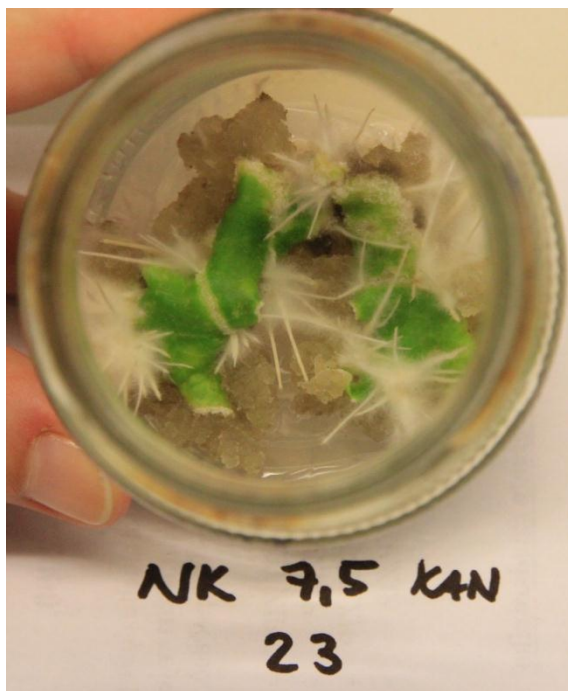
Podařilo se nám vypěstovat kalusovou kulturu z rostliny N.T. mGM-CSF 23 i z rostliny N.T. LA Burley 21. Kalusovou kulturu N.T. LA Burley 21 zobrazuje Obr. 12.



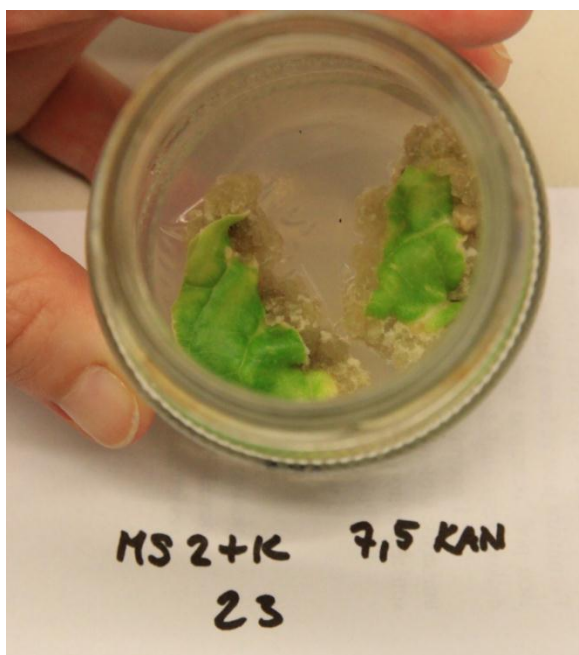
Obr. 8 Disk rostliny N.T. mGM-CSF 23, médium NK1 bez sacharózy



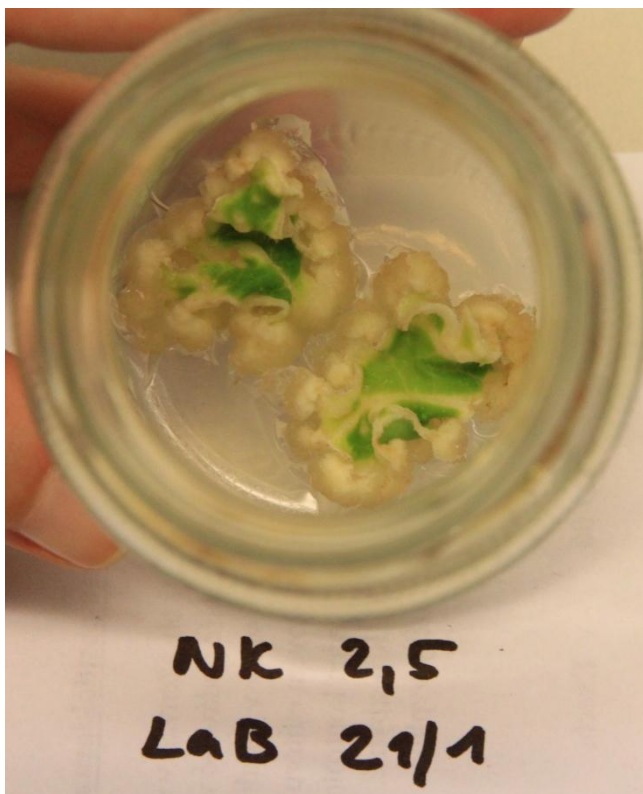
Obr. 9 Kalusová kultúra odvozená od rostliny N.T. mGM-CSF 23, médium NK1 s koncentracií sacharózy 10g na 1 L média



Obr. 10 Kalusová kultura odvozená od rostliny N.T. mGM-CSF 23, médium NK1 s koncentrací sacharózy 30 g na 1 L média



Obr. 11 Kalusová kultura odvozená od rostliny N.T. mGM-CSF 23, médium 2+K s koncentrací sacharózy 30 g na 1 L média



Obr. 12 Obr. 11 Kalusová kultura odvozená od rostliny N.T. LA Burley 21, médium NK1 s koncentrací sacharózy 10 g na 1 L média

6 DISKUZE

Pomocí detekční metody Slot Blot, jsem měla prokázat přítomnost cytokinu mGM-CSF v rostlinných vzorcích. S touto metodou jsme měli určité problémy, i přesto že jsme požadovaných výsledků dosáhli, bylo by možné tuto metodu pro daný materiál ještě upravit. Problémem, s kterým jsme se během měření s touto metodou setkali, byl technický problém se spodní destičkou Slot Blot rámečku. Aby bylo možné nanést správné množství vzorku, je třeba, aby byla přebytečná tekutina ze spodní destičky odváděna. Nám se ale ve všech měřeních stalo, že destička nedostatečně těsnila a některé vzorky se rozpily mimo oblast detekčního bodu (pravděpodobně vadný výrobek). Další možností by bylo vyzkoušet jinou metodu.

Metoda vhodná pro stanovení přítomnosti cytokinu mGM-CSF ve vzorcích, je ELISA metoda. Touto metodou jsme schopni určit nejen přítomnost, ale i množství cytokinu mGM-CSF ve všech transgenních rostlinných liniích. Nejvyšší obsah tohoto cytokinu byl v rostlině N.T. mGM-CSF 23, kde jsme naměřili 3,25 μg cytokinu na 1 g vzorku. I přesto, že to byla hodnota nejvyšší, neměřili jsme hodnoty tak vysoké jako polský tým pod vedením Anny Góra-Sochacky. Jejich hodnoty cytokinu mGM-CSF v transgenní rostlině tabáku se pohybovaly mezi 8 až 19 μg na 1 g vzorku. (Góra-Sochacka et al., 2009)

Rozdíly mezi hodnotami naměřenými u různých linií mohou mít svou souvislost. Transgenní rostlina s označením N.T. mGM-CSF 23 a N.T. mGM-CSF 24 je matečnou rostlinou. Je to tedy původní transgenní rostlina, která byla vypěstována v umělých podmínkách, na rozdíl od transgenní rostliny N.T. mGM-CSF 43, která je až druhou generací, byla vypěstována ze semen matečné rostliny. Jak se ve své teoretické části zmiňuji, je možné, že semena matečné rostliny mohou mít gen umlčený nebo sníženou expresi. Je tedy možné, že právě proto jsme naměřili u vzorků rostliny N.T. mGM-CSF 43 nižší hodnoty cytokinu než u rostliny N.T. mGM-CSF 23 a 24.

Nízké hodnoty jsme naměřili u transgenních rostlin N.T. GM-UreB 17 a N.T. GM-UreB 31. Tyto rostliny obsahovaly kromě genu pro cytokin mGM-CSF ještě gen pro UreB. Jelikož naměřené hodnoty celkového proteinu nebyly u těchto rostlin o tolik nižší než u linií jen s genem pro mGM-CSF, lze předpokládat, že druhý gen této rostliny potlačil expresi genu mGM-CSF a naměřené hodnoty pak byly nízké.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo převedení rostliny tabáku na kalusovou kulturu. Podařilo se mi úspěšně převést transgenní rostlinu *Nicotiana tabacum* mGM-CSF na kalusovou kulturu. Přítomnost cytokinu mGM-CSF byla ověřena pomocí ELISA analýzy ve výchozích rostlinách. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u linie GM-CSF 23, a to 3,250 μg na 1 g čerstvé hmotnosti listu. Na základě těchto výsledků jsem vyselektovala tuto linii jako vhodnou k odvození kalusové kultury s potenciálem produkovat mGM-CSF. Cytokin byl v rostlinách potvrzen také pomocí metody Slo Blot v několika měřeních. Z těchto výsledků se dá předpokládat, že kalusové kultury jsou schopny cytokin mGM-CSF produkovat.

Takto připravená kalusová kultura by se mohla stát zdrojem pro odvození suspenzní kultury, která by v bioreaktorovém systému ve velkoobjemových kulturách produkovala cytokin mGM-CSF.

8 Použité zkratky

- G-CSF faktor stimulujiící zrání granulocytů
- GM-CSF faktor stimulujiící zrání granulocytů a makrofágů
- mGM-CSF myší GM-CSF
- hGM-CSF lidský GM-CSF
- IL interleukin
- INF interferon
- Kan kanamycin
- M-CSF faktor stimulujiící zrání makrofágů
- MS médium médium Murashigeho a Skoogovo
- NBT/BICP nitro-blue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate solution
- NK negativní kontrola
- N.T. Nicotiana tabacum
- STD standard
- TNF tumor nekrotizující faktor
- WT wild type, divoký typ
- -H médium médium bez hormonů


9 Literární zdroje

- Anna Góra-Sochacka, Patrycja Redkiewicz, Bogusława napiórkowska, Dali Gaganidze, Robert Brodzik a Agnieszka Sirko, Recombinant Mouse Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Glycosylated in Transgenic Tobacco and Maintains Its Biological Activity, *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2010
- *proff. Don Metcalf, Walter a Eliza Hall Institute of Medical Research* [online]. [cit. 2013-08-03]. Dostupné z http://www.wehi.edu.au/about_us/achievements/professor_don_metcalf/#CSFs
- Eddie A. James, Changlin Wang, Zeping Wang, Raymond Reeves, Joong han Shin, Nancy S. Magnuson and James M. Lee, Production and Characterization of Biologically Active Human GM-CSF Secreted by Genetically Modified Plant Cells, *Protein Expression and Purification* 19, 131-138, 2000, celý text je dostupný na www.idealibrary.com
- *GM-CSF Cytokines & Cells Encyclopedia – COPE* [online]. [cit. 2013-07-24]. Dostupné z <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=GM-CSF>
- Ilja Trebichavský, 2013, Živa 3/2013, časopis pro biologickou práci, Akademie věd ČR
- Prof. Ivo Bianchi, MD, PharmDr. Lucie Kotlářová, 2012, Cytokiny, Buněčná komunikace, 166 stran
- Jan Krejsek (2013) *Cytokiny a jejich úloha v regulacích imunitního systému* [online]. [cit. 2013-03-05]. Dostupné z <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/AJCIV.htm>
- J. Neumanitis (2003) Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor: review from preclinical development to clinical application.

- Jitka Blažíčková (2007) : Rostlinné kultury a jejich použití pro studium biologie telomer. Bakalářská práce. Oddělení genetiky a molekulární biologie. Ústav experimentální biologie. Přírodovědecká fakulta. Masarykova Univerzita, Brno.
- RNDr. Luděk Šefc, CSc. (2011), [online]. [cit. 2013-07-27]. Dostupné z <http://patofyziologie.lf1.cuni.cz/file/298/Cytokiny.pdf>
- Martin Fusek, Jan Káš, Tomáš Ruml, Bioléčiva, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008, str. 76
- Murashige T., and Skoog F., 1962 A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol.* 15, 437-497.
- Pal Maliga a Ian Graham, Molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops, *Plant Biotechnology* 2004, 7:149-151. Celý text dostupný na www.sciencedirect.com
- *Pokročilé biochemické a biotechnologické metody, Genetická transformace obilovin* [online]. [cit. 2013-08-10]. Dostupné z <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/10.%20Obiloviny.pdf>
- *Pracoviště molekulární biologie - Transgenní rostliny* [online]. [cit. 2013-07-22]. Dostupné z <http://www.molecularbiology.symplia.eu/oblasti-vyzkumu/transgenni-rostliny>
- Rainer Fisher, Eva Stoger, Stefan Schillberg, Paul Christou a Richard M. Twyman, Plant-based production of biopharmaceuticals, *Current Opinion in Plant Biology* 2004, 7: 152-158, celý text dostupný na www.sciencedirect.com
- Rainer Fisher, Richard M. Twyman, Stefan schillberg, Production of antibodies in plants and their use for global health, *Vaccine* 21, 2003, 820-825

- *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit 2013-08-20]. Dostupné z http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=L03AA#L03AA

10 Příloha



BioLegend
The path to legendary discovery™

Mouse GM-CSF

ELISA MAX™ Deluxe Sets

Cat. No. 432204 (5 Plates)
432205 (10 Plates)
432206 (20 Plates)

BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Sets contain the components necessary for the accurate quantification of natural and recombinant mouse GM-CSF. These sets are designed for cost-effective and accurate quantification of mouse GM-CSF in cell culture supernatant, serum, plasma or other biological fluids. They are sensitive, accurate, and robust. **It is highly recommended that this instruction sheet be read in its entirety before using this product. Do not use this set beyond the expiration date.**

Materials Provided

1. Mouse GM-CSF ELISA MAX™ Capture Antibody (200X)
2. Mouse GM-CSF ELISA MAX™ Detection Antibody (200X)
3. Mouse GM-CSF Standard
4. Avidin-HRP (1000X)
5. Substrate Solution A
6. Substrate Solution B
7. Coating Buffer A (5X)
8. Assay Diluent (5X)
9. NUNC MaxiSorp™ 96 MicroWell Plates
10. Instruction Sheet
11. Lot-Specific Instruction/ Analysis Certificate

Introduction

GM-CSF is a hematopoietic factor that is produced by T cells, macrophages, fibroblasts and endothelial cells. This multifunctional cytokine stimulates progenitor cells of neutrophils, eosinophils and macrophages. GM-CSF is also a differentiation and activating factor for granulocytic and monocytic cells.

Principle of the Test

BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Set is a sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A mouse GM-CSF specific monoclonal antibody is first coated on a 96-well plate. Standards and samples are added to the wells, and GM-CSF binds to the immobilized capture antibody. Next, a biotinylated anti-mouse GM-CSF detection antibody is added, producing an antibody-antigen-antibody "sandwich". Avidin-horseradish peroxidase is subsequently added, followed by TMB Substrate Solution, producing a blue color in proportion to the concentration of GM-CSF present in the sample. Finally, the Stop Solution changes the reaction color from blue to yellow, and the microwell absorbance is read at 450 nm with a microplate reader.

For research purposes only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Performance Characteristics

Sensitivity: The expected minimum detectable concentration of GM-CSF for this set is 16 pg/mL.

Specificity: No cross reactivity was observed when this kit was used to analyze multiple human, mouse and rat recombinant proteins.

Troubleshooting

High Background:

- Background wells were contaminated.
- Matrix used had endogenous analyte.
- Plate was insufficiently washed.
- TMB Substrate Solution was contaminated.

No signal:

- Incorrect or no antibodies were added.
- Avidin-HRP was not added.
- Substrate solution was not added.
- Wash buffer contains sodium azide.

Low or poor signal for the standard curve:

- Standard was incompletely reconstituted or was stored improperly.
- Reagents were added to wells with incorrect concentrations.
- Plates was incubated with improper temperature, timing or agitation.
- Signal too high, standard curves saturated.
- Standard was reconstituted with less volume than required.
- One or more reagent incubation steps were too long.
- Plate was incubated with inappropriate temperature, timing, or agitation.

Sample readings out of range:

- Samples contain no or below detectable levels of analyte.
- Samples contain analyte concentrations greater than highest standard point.


High variations in samples and/or standards:

- Pipetting errors may have occurred.
- Plate washing was inadequate or nonuniform.
- Samples were not homogeneous.
- Samples or standard wells were contaminated.

Assay Procedure Summary

1. Coat plate with 100 µl diluted Capture Antibody
Incubate overnight, 4°C
2. Wash 4 times
Add 200 µl 3X Assay Diluent
Incubate 1 hr, RT, shaking
3. Wash 4 times
Add 100 µl diluted standards and samples
Incubate 2 hrs, RT, shaking
4. Wash 4 times
Add 100 µl diluted Detection Antibody
Incubate 1 hr, RT, shaking
5. Wash 4 times
Add 100 µl Avidin-HRP
Incubate 30 min, RT, shaking
6. Wash 5 times
Add 100 µl TMB Substrate Solution
Incubate 15 min, RT, in the dark
7. Add 100 µl Stop Solution
8. Read absorbance at 450 nm and 570 nm

BioLegend, Inc.
11080 Roselle Street, San Diego, CA 92121
Tel: 1-858-455-9585, Fax: 1-858-455-9587
www.biolegend.com



For other technical resources, please visit:
www.biolegend.com/support or
 email: techserv@biolegend.com

Obr. 13 Originální návod ELISA MAX Deluxe sets od BioLegend, str. 1

Materials to be Provided by the End-User

- A microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm
- Adjustable pipettes to measure volumes ranging from 2 μ l to 1 mL
- Deionized (DI) water
- PBS (Phosphate-Buffered Saline): 8.0 g NaCl, 1.16 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, add deionized water to 1 L; pH to 7.4, 0.2 μ m filtered.
- Wash Buffer: PBS with 0.05% Tween-20, pH 7.4. BioLegend Cat. No. 421601 is recommended.
- Wash bottle or automated microplate washer
- Stop Solution (2N H₂SO₄)
- Log-log graph paper or software for data analysis
- Tubes to prepare standard dilutions
- Timer
- Plate Sealer
- Absorbent paper

Storage Information

- Store kit components at 4°C.
- After reconstitution of the lyophilized standard with 1X Assay Diluent, a liquid into polypropylene vials and store at -70°C. Do not repeatedly freeze/thaw the recombinant protein standard as loss of activity may occur.
- Prior to use, bring all components to room temperature (18-25°C). Upon assay completion return all components to appropriate storage conditions.

Health Hazard Warnings

- Reagents that contain preservatives may be harmful if ingested, inhaled or absorbed through the skin. Refer to the MSDS online for details (www.biolegend.com/support/lmstds).
- Substrate Solution A and Substrate Solution B are harmful if ingested. Additionally, avoid skin, eye or clothing contact.
- To reduce the likelihood of blood-borne transmission of infectious agents, handle all serum and/or plasma in accordance with NCCLS regulations.

Specimen Collection and Handling

Cell Culture Supernatant: If necessary, centrifuge to remove debris prior to analysis. Samples can be stored at < -20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Serum: Use a serum separator tube and allow clotting for at least 30 minutes, then centrifuge for 10 minutes at 1,000 Xg. Remove serum layer and assay immediately or store serum samples at < -20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles. Serum specimens should be clear and non-hemolyzed.

Plasma: Collect blood sample in a citrate, heparin or EDTA containing tube. Centrifuge for 10 minutes at 1,000X g within 30 minutes of collection. Assay immediately or store plasma samples at < -20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles. Plasma specimens should be clear and non-hemolyzed.

Reagent Preparation

- Do not mix reagents from different sets or lots. Reagents and/or antibodies from different manufacturers should not be used with this set. All reagents should be diluted immediately prior to use.**
- Dilute 5X Coating Buffer to 1X with deionized water. For one plate, dilute 2.4 mL 5X Coating Buffer in 9.6 mL deionized water.
 - Dilute pre-titrated Capture Antibody 1:200 in 1X Coating Buffer. For one plate, dilute 60 μ l Capture Antibody in 11.94 mL 1X Coating Buffer.

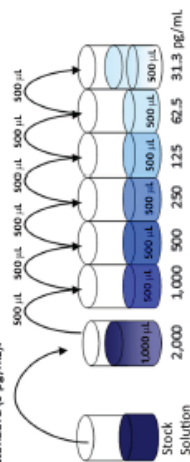
- Dilute 5X Assay Diluent to 1X with PBS (pH 7.4). For 50 mL, dilute 10 mL 5X Assay Diluent in 40 mL PBS.
NOTE: Precipitation of 5X Assay Diluent may be observed when stored long term at 4°C. The precipitation does not alter the performance of the Buffer. If heavy precipitation is observed after the dilution to 1X Assay Diluent, it can be filtered to clarify the solution.
- Lyophilized vials are under vacuum pressure. Reconstitute lyophilized standard with 0.2 mL of 1X Assay Diluent. Allow the reconstituted standard to sit for 15 minutes at room temperature, then mix gently prior to making dilutions.
- Prior to use, prepare 1,000 μ l of the top standard at a concentration of 2,000 pg/mL from the stock solution in Assay Diluent (refer to Lot-Specific Instruction/Analysis Certificate).
- Dilute the pre-titrated Biotinylated Detection Antibody 1:200 in 1X Assay Diluent. For one plate, dilute 60 μ l Detection Antibody in 11.94 mL Assay Diluent.
- Dilute Avidin-HRP 1:1000 in 1X Assay Diluent. For one plate, dilute 12 μ l Avidin-HRP in 11.98 mL Assay Diluent.
- TMB Substrate Solution is a mixture of equal volumes of Substrate Solution A with Substrate Solution B. Mix the two components immediately prior to use. For one plate mix 6 mL Substrate Solution A with 6 mL of Substrate Solution B in a clean container (solution should be clear and colorless).

Assay Procedure

Do not use sodium azide in any solutions as it inhibits the activity of the horseradish-peroxidase enzyme.

- One day prior to running the ELISA, dilute Capture Antibody in 1X Coating Buffer A as described in Reagent Preparation. Add 100 μ l of the Capture Antibody and incubate overnight (16-18 hrs) at 4°C.
- Bring all reagents to room temperature (RT) prior to use. It is strongly recommended that all standards and samples be run in duplicate or triplicate. A standard curve is required for each assay.
- Wash plate 4 times with at least 300 μ l Wash Buffer per well and blot residual buffer by firmly tapping plate upside down on absorbent paper. All subsequent washes should be performed similarly.
- To block non-specific binding and reduce background, add 200 μ l 1X Assay Diluent per well.
- Seal plate and incubate at RT for 1 hour with shaking at 200 rpm on a plate shaker.

- While plate is being blocked, prepare the appropriate sample dilutions (if necessary) and standards.
- Prepare 1,000 μ l of top standard at 2,000 pg/mL from stock solution in 1X Assay Diluent (refer to Lot-Specific Instructions/Analysis Certificate). Perform six two-fold serial dilutions of the 2,000 pg/mL top standard with Assay Diluent in separate tubes. After diluting, the mouse GM-CSF standard concentrations are 2,000 pg/mL, 1,000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, and 31.3 pg/mL. Assay Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



- Wash plate 4 times with Wash Buffer.
- Add 100 μ l/well of standards or samples to the appropriate wells. If dilution is required, samples should be diluted in 1X Assay Diluent before adding to the wells.
- Seal plate and incubate at RT for 2 hours with shaking.
- Wash plate 4 times with Wash Buffer.
- Add 100 μ l of diluted Detection Antibody solution to each well, seal plate and incubate at RT for 1 hour with shaking.
- Wash plate 4 times with Wash Buffer.
- Add 100 μ l of diluted Avidin-HRP solution to each well, seal plate and incubate at RT for 30 minutes with shaking.
- Wash plate 5 times with Wash Buffer. For this final wash, soak wells in Wash Buffer for 30 seconds to 1 minute for each wash. This will help minimize background.
- Add 100 μ l of freshly mixed TMB Substrate Solution and incubate in the dark for 15 minutes*. Positive wells should turn blue in color. It is not necessary to seal the plate during this step.
- Stop reaction by adding 100 μ l of Stop Solution to each well. Positive wells should turn from blue to yellow.
- Read absorbance at 450 nm within 30 minutes. If the reader can read at 570 nm, the absorbance at 570 nm can be subtracted from the absorbance at 450 nm.

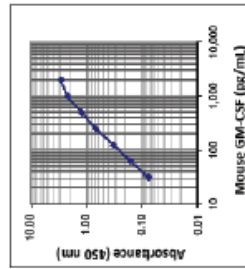
*Optimal substrate incubation time depends on laboratory conditions and the optical linear ranges of ELISA plate readers.

Calculation of Results

Plot the standard curve on log-log axis graph paper with analyte concentration on the x-axis and absorbance on the y-axis. Draw a best fit line through the standard points. To determine the unknown analyte concentrations in the samples, find the absorbance value of the unknown on the y-axis and draw a horizontal line to the standard curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the x-axis and read the corresponding analyte concentration. If the samples were diluted, multiply by the appropriate dilution factor. The data is best calculated with computer-based curve-fitting software using a 5- or 4-parameter logistics curve-fitting algorithm. If a test sample's absorbance value falls outside the standard curve ranges, that test sample needs to be reanalyzed at a higher or lower dilution as appropriate.

Typical Data

Standard Curve: This standard curve was generated at BioLegend for demonstration purposes only. A standard curve must be run with each assay.



Obr. 14 Originální návod ELISA MAX Deluxe sets od BioLegend, str. 2