



- Plotny jsou lepší větší, tj. 18 x 8,5 cm, vejde se tam více vzorků. Na toto plotnu je potřeba 16 – 20 ml agarózy / lepší je 20 ml, protože bude silnější vrstva gelu, nebude se tolik trhat při sekání jamek a nebude vytékat vzorek z jamky /. Plotny naléváme na vyvážené podložce. Naléváme pipetou / 20 ml /, kterou nejprve propláchneme teplou vodou / z lázně /. Po nalití opět propláchneme teplou vodou, aby agaróza nezatuhla v pipetě. Nalíváme rychle, aby gel nezatuhl a nebyl různě silný. Gel necháme pár desítek minut zatuhnout.
- Gel uchovávat vždy ve vlhké komůrce, aby nevyschl. Komůrka: nádoba s vlhkou buničinou. Plotny bez vzorků uchovávat v lednici / ne moc dlouho, nedal jsem nic proti plísním... /. Plotny se vzorkama v komůrce za laboratorní teploty.
- Jamky vysekáváme do gelu pomocí zbroušené jehly o průměru cca 2 mm. Tuto jehlu nasadíme na vývěvu a kolmo na plotnu ji zapíchneme do gelu. Po vyndání je jamka hotova. Rozmístění jamek na plotně je nejlepší nakreslit na papír, na kterém potom sekáme jamky. Na plotně 18 x 8,5 cm je ideální rozložení 8 x 5 jamek. Jako označení orientace plotny je dobré seříznout některý roh.

#### 5. Nanášení vzorků:

- Každá plotna / protože jsou různě silné / musí mít kalibraci. Kalibrace lysozymu / Sigma EC3.2.1.17 /:
  1. 2 mg/ml
  2. 5 mg/ml
  3. 10 mg/ml
  4. 15 mg/ml
  5. 20 mg/ml
- Do jedné jamky 2  $\mu$ l kalibračního roztoku nebo vzorku. Možno vše jednou špičkou, má nesmáčivý povrch, ale hemolymfa pění, takže stejně tak po 4 použitích je nutno vyměnit špičku. Každý vzorek do dvou jamek = paralelně, pak se bude počítat průměr. Vzorky na okrajích jsou někdy zkresleny, protože gel je slabší, nebo naopak silnější, ideální je střední část plotny.
- Inkubace plotny ve vlhké komůrce za laboratorní teploty 24 – 48 hodin. Pokud je moc dlouhá, zóny se rozplíznou a odečet je špatný.
- Odečítá se průměr difúzní zóny speciálním měřítkem oproti černému podkladu. Čím větší zóna, tím horší odečet a větší zkreslení výsledků.