

# Mikroskopie živých rostlin značených GFP

## ***Příprava roztoků a pomůcek***

### **Sterilizační roztok**

- 5 g hypochlorid vápenatý
- 100 ml dd H<sub>2</sub>O
- 500 µl 10 % Tritonu X 100 (výsledná koncentrace Tritonu X 100 je 0.05 %)

Mícháme nejméně 2 hodiny, zbytek nerozpuštěné soli necháme sedimentovat a teprve pak používáme. Uchováváme 1 měsíc při 4 °C ve tmě.

### **0.05% roztok Tritonu X 100**

- 100 ml dd H<sub>2</sub>O
- 500 µl 10 % Tritonu X 100

Musí být vždy sterilní; tzn. je nutno před každým použitím vysterilizovat.

**Pozn.:** TRITON SLOUŽÍ JAKO SMÁČEDLO. JE NUTNÉ JEJ PŘIDAT DO STERILIZAČNÍHO ROZTOKU I DO VODY NA OPLACH SEMÍNEK

### **MS médium 500 ml**

- 2.15 g MS
- 0.25 g MES
- 5 g sacharózy
- upravíme pH na 5.7-5.9 pomocí 1M KOH
- 5 g Plant agaru (1%)

Sterilizujeme a po ochlazení rozléváme do Petriho misek sterilně ve flowboxu. Používáme ihned po ztuhnutí nebo uchováváme v lednici při 4 °C k pozdějšímu použití.

### **Sterilní filtrační papíry**

### **Sterilní párátko**

### **Roztok 75 % etanolu na sterilizaci**

používáme na **pinzetu**, kterou si v roztoku namáčíme, ožehněme a použijeme na sterilní přípravu párátek a filtračních papírů

## ***Příprava Arabidopsis DR5-GFP linií k mikroskopii***

### **Postup**

1. Příprava MS pevného média
2. Sterilizace semínek
3. Výsev na pevné médium
4. Kultivace
5. Příprava mikroskopického preparátu

## 1. Příprava MS pevného média

- podle základního rozpisu si připravíme tekuté MS médium a upravíme u něj pH
- do láhve k naváženému Plant agaru přidáme tekuté MS médium
- vysterilizujeme a po ochlazení sterilně rozlijeme v boxu do Petriho misek, kde necháme v nedovřených miskách médium ztuhnout

## 2. Sterilizace semínek

- do mikrozkušavky o objemu 1.5 ml dáme potřebné množství semínek, které chceme vysít a dobře označíme
- přidáme 1 ml sterilizačního roztoku, mícháme 15 minut  
**Pozn.** Nenecháváme ve sterilizačním roztoku déle, protože hypochlorid vápenatý je pro semínka toxický.

### ↓ DÁLE PRACUJEME STERILNĚ VE FLOWBOXU ↓

- semínka v mikrozkušavce opláchneme 3 x 0.05% roztokem Tritonu X 100 tak, že nejdříve zcela odpipetujeme sterilizační roztok a přidáme 1 ml 0.05% roztoku Tritonu X 100, zavřeme, otáčením mikrozkušavky dnem vzhůru promícháváme a následně roztok odebereme.
- po trojnásobném propláchnutí přidáme 0.5 ml 0.05% roztoku Tritonu
- do Petriho misky si připravíme sterilní filtrační papír
- roztok se semínky nasajeme mikropipetou a přeneseme na filtrační papír v Petriho misce

## 3. Výsev na pevné médium

- výsev na MS médium provádíme tak, že nabereme párátkem jedno semínko a lehce jej položíme na médium (NEZATLAČUJEME!)
- po vysetí zavřeme misku, kterou dokola omotáme prodyšnou páskou SPOFAPOREM
- takto připravené misky zabalíme do alobalu a inkubujeme 2 dny v lednici při 4°C, aby došlo k „probuzení“ semínek z dormance („spánku“)

## 4. Kultivace

- po dvou dnech inkubace, následující den ráno vložíme misky vertikálně do kultivačního boxu s předem nastavenými podmínkami kultivačního cyklu:
  - a) den-noc
  - b) teplota ve dne
  - c) teplota v noci
  - d) vlhkost
  - e) osvětlenípodle pokynů vyučujícího

## 5. Příprava preparátu k mikroskopii

- po asi 10 dnech máme na miskách malé semenáčky, které opatrně pinzetou přeneseme z média na podložní sklo s dd H<sub>2</sub>O
- přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme pod mikroskopem