

Stanovení koncentrace bílkovin a hmotnosti bakteriální sušiny Bradfordovou metodou

Úkol 1: Stanovení hmotnosti sušiny bakterií

Úvod.

Stanovení hmotnosti sušiny bakterií lze využít v některých experimentech, například při studiu enzymatické aktivity buněk. V běžných experimentech se enzymová aktivita vztahuje k hmotnosti sušiny, bílkovinám, dusíku atd. Stanovením hmotnosti sušiny bakterií lze porovnat metabolickou aktivitu mikrobiálních buněk.

Chemikálie: fosfátový pufr.

Přístroje: centrifuga, vortex, spektrofotometr Spekol 11, zkumavky, pipety, váženky, analytické váhy, exsikátory.

Mikroorganismy: *Bacillus subtilis*.

Postup.

1. 24hodinová kultura *Bacillus subtilis* byla odstředována při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut při 4 °C.
2. Supernatant byl poté dekantován a kultura promyta fosfátovým pufrům, který byl postupně přidáván za současného víření. Centrifugace byla opakována, když objem odstředivky dosáhl přibližně 60 % její kapacity. Tento proces byl proveden celkem třikrát.
3. Po posledním odstředění a vylití supernatantu bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru a kultura a pufr byly za současného víření odpipetovány do zkumavky.
4. Vlnová délka spektrofotometru Spekol 11 byla nastavena na 620 nm a kultivační médium bylo naředěno ve třech zkumavkách na 90 % (T = 10), 80 % (T = 20) a 70 % (T = 30) zákalu.
5. Čtyři zkumavky byly poté zváženy a jejich hmotnost byla zaznamenána. Do váženky byly odpipetovány 2 ml kultury zředěné na 90% zákal, 2 ml kultury zředěné na 80% zákal a 2 ml kultury zředěné na 70% zákal. Do poslední vážicí láhve byly napipetovány 2 ml fosfátového pufru jako referenční vzorek.
6. Sušilo se při 106 °C a po 24 hodinách se zvážilo.
7. Na základě hodnot získaných z vážení byla vypočtena hmotnost sušiny bakteriální suspenze v mg/ml.

Výsledky:

$$S = (V_s - V) / 2 - (V_p - V) / 2$$

V_s ... Hmotnost váženky obsahující 2 ml bakteriální suspenze

V ... Hmotnost použité vážicí láhve.

V_p ... Hmotnost vážicí lahvičky obsahující 2 ml fosfátového pufru

S ... Hmotnost pevných látek v bakteriální suspenzi (mg/ml).

Tabulka č. 1: Naměřené hmotnosti použitých váženek a váženek s 2 ml bakteriální suspenze

Zákal (%)	Vs (mg)	V (mg)
90	13853,3	13841,3
80	14393,2	14381,3
70	13103,7	13092,0

Fosfátový pufr:

$V_p = 13320,6$ mg

$V = 13309,7$ mg (hmotnost použité váženky)

$S_{90} = 0,55$ mg/ml

$S_{80} = 0,50$ mg/ml

$S_{70} = 0,40$ mg/ml

Tabulka č. 2: Vypočítané hmotnosti bakteriální sušiny

<i>Bacillus subtilis</i>			
Zákal (%)	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) 1. skupina	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) 2. skupina	Hmotnost bakteriální sušiny (mg/ml) průměr
90	0,55	0,65	0,60
80	0,50	2,50	1,50
70	0,40	13,6	7,00

Problém 2: Bradfordova metoda stanovení koncentrace bílkovin

Úvod.

Mezi metody měření koncentrace bílkovin patří Kjeldahlova, Biuretova, BCA a Lowryho metoda nebo Bradfordova metoda, která byla použita v tomto cvičení. Princip Bradfordovy metody spočívá v tom, že vazba Coomassieho brilantní modři G-250 na molekulu bílkoviny způsobí posun absorpčního maxima ze 464 nm na 595 nm. Absorbance při 595 nm se používá jako ukazatel koncentrace bílkovin. Pro přesnější výsledky je důležité, aby měl standardní roztok bílkoviny podobné složení jako testovaný vzorek. Citlivost této metody se uvádí 1 mg/ml a závisí na obsahu bazických a aromatických aminokyselin. Bradfordova metoda je méně spolehlivá než metoda BCA kvůli negativním účinkům detergentů (SDS, Triton). Složení činidla Bradfordovy metody: barvivo, ethanol, H_3PO_4 ; po reakci s bílkovinou se barva mění z hnědé na modrou.

Chemikálie: fosfátový pufr, roztok lidského albuminu, Coomassie Brilliant Blue G250.

Vybavení: vortex, odstředivka, spektrofotometr Specol 11, zkumavky, pipety.

Mikroorganismy: *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis*).

Postup.

1. Nejprve byla připravena kalibrace s použitím lidského albuminu, který se použije jako standard.

2. Albumin byl naředěn ve fosfátovém pufru v pěti zkumavkách na koncentrace 200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml a 1000 µg/ml.

3. Do všech pěti zkumavek bylo přidáno 5 ml Coomassie Brilliant Blue G250 a byla změřena absorbance při 595 nm. Získané hodnoty absorbance byly vyneseny do grafu a vytvořena kalibrační křivka a rovnice, která byla použita k výpočtu koncentrace vzorku.

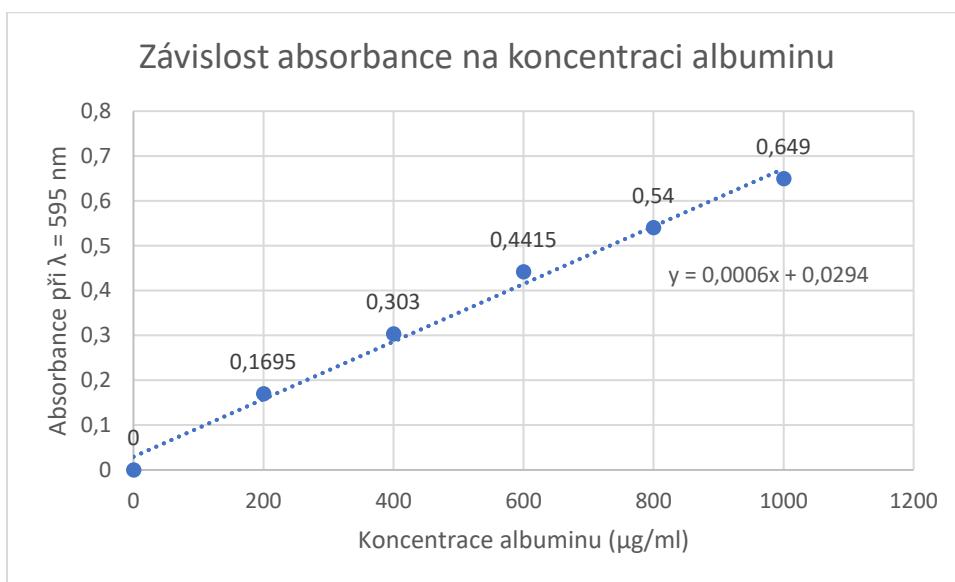
4. Z každého vzorku o zákalu 90 %, 80 % a 70 % bylo odpipetováno 0,1 ml, čímž byly získány tři vzorky.

5. Ke vzorkům bylo přidáno 5 ml Coomassie Brilliant Blue G250 a měřilo se při 595 nm. Koncentrace bílkovin každého vzorku byla vypočtena pomocí kalibrační rovnice.

Výsledky:

Tabulka č. 3: Naměřené hodnoty absorbance při daných koncentracích albuminu

Zkumavka č.	Koncentrace albuminu (µg/ml)	Absorbance (1. skupina)	Absorbance (2. skupina)	Absorbance (průměr)
1	0	0,000	0,000	0,000
2	200	0,188	0,151	0,1695
3	400	0,321	0,285	0,303
4	600	0,433	0,450	0,4415
5	800	0,585	0,495	0,540
6	1000	0,687	0,611	0,649



Tabulka č. 4: Vypočítaná koncentrace bílkovin

Bacillus subtilis

Zákal (%)	Absorbance 1. skupina	Absorbance 2. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) 1. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) 2. skupina	Koncentrace bílkovin (µg/ml) průměr
90	0,132	0,083	171,000	89,333	130,167
80	0,106	0,042	127,667	21,000	74,334
70	0,080	0,037	84,333	12,667	48,500

Závěr.

Průměrná hmotnost sušiny *Bacillus subtilis* je 0,60 mg/ml při 90% zákalu, 1,50 mg/ml při 80% zákalu a 7,00 mg/ml při 70% zákalu. Rozdíl v hodnotách mezi skupinou 1 a skupinou 2 lze přičíst nepřesnému pipetování kultur do vážicích lahví nebo nepřesnému vážení. Koncentrace bílkovin naměřené Bradfordovou metodou jsou 130 167 µg/ml při 90% zákalu, 74 334 µg/ml při 80% zákalu a 48 500 µg/ml při 70% zákalu. Rozdíl v hodnotách mezi skupinami se stále považuje za důsledek nepřesného pipetování vzorků.