

Stanovení koncentrace bílkovin metodou Bradfordové a stanovení bakteriální sušiny

Úkol č. 1: Stanovení bakteriální sušiny

Úvod:

Stanovení bakteriální sušiny je možné využít při některých pokusech, například při studiu enzymatické aktivity buněk. V běžné laboratorní praxi je enzymatická aktivita vztahována na sušinu, bílkovinu, dusík apod. Stanovení bakteriální sušiny umožňuje porovnání metabolické aktivity mikrobiálních buněk.

Chemikálie: fosfátový pufr

Nástroje: centrifuga, vortex, spektrofotometr Spekol 11, zkumavky, pipeta, váženky, analytické váhy, exsikátor

Mikroorganismus: *Bacillus subtilis*

Postup:

1. 24 hodinovou kulturu *Bacillus subtilis* jsme centrifugovali 15 min při 10 000 ot./min a 4 °C.
2. Poté jsme odlil supernatant a kulturu jsme promyli fosfátovým pufrům, který jsme postupně přilévávali a zároveň vortexovali. Když jsme dosáhli objemu cca 60 % centrifugační zkumavky, tak jsme centrifugaci opakovali. Tento proces jsme provedli celkem 3x.
3. Po poslední centrifugaci a slití supernatantu jsme přidali 10 ml fosfátového pufru, zvortexovali a odpipetovali jsme kulturu s pufrům do zkumavky.
4. Poté jsme na spektrofotometru Spekol 11 nastavili vlnovou délku na 620 nm a ředili jsme kulturu do 3 zkumavek na zákal 90 % (T = 10), 80 % (T = 20) a 70 % (T = 30).
5. Následně jsme si zvážili 4 váženky a jejich hmotnost jsme si zaznamenali. Do váženek jsme napipetovali 2 ml kultury zředěné na 90% zákal, 2 ml 80% zákal a 2 ml 70% zákal. Do poslední váženky jsme napipetovali 2 ml fosfátového pufru jako referenční vzorek.
6. Váženky jsme dali sušit při 106 °C a po 24 hod zvážili.
7. Na základě hodnot získaných vážením jsme vypočítali hmotnost bakteriální sušiny v mg/ml bakteriální suspenze.

Výsledky:

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

V_s ... hmotnost váženky s 2 ml bakteriální suspenze

V ... hmotnost použité váženky

V_p ... hmotnost váženky s 2 ml fosfátového pufru

S ... hmotnost bakteriální sušiny v mg/ml bakteriální suspenze

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

Úkol č. 2: Metoda Bradfordové pro stanovení koncentrace bílkovin

Úvod:

Metod pro stanovení koncentrace bílkovin je několik, například Kjeldahlova metoda, biuretova metoda, BCA metoda, Lowryho metoda nebo metoda Bradfordové, kterou jsme ve cvičení prováděli. Principem metody Bradfordové je vazba Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu, při čemž dochází k posunu absorpčního maxima z 464 nm na 595 nm. Absorbance při 595 nm je použita jako měřítko koncentrace bílkovin. Pro přesnější výsledky je důležité, aby standardní roztok bílkoviny měl obdobné složení jako testovaný vzorek. Citlivost této metody se uvádí jako 1 mg/ml a je závislá na obsahu bazických a aromatických aminokyselin. Spolehlivost metody Bradfordové je nižší než u BCA metody, protože u metody Bradfordové působí negativně detergenty (SDS, Triton). Složení činidla u metody Bradfordové je barvivo, etanol a H_3PO_4 . Po reakci s proteinem dojde ke změně barvy z hnědé na modrou.

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

Nástroje: vortex, centrifuga, spektrofotometr Spekol 11, zkumavky, pipeta

Mikroorganismus: *Bacillus subtilis*

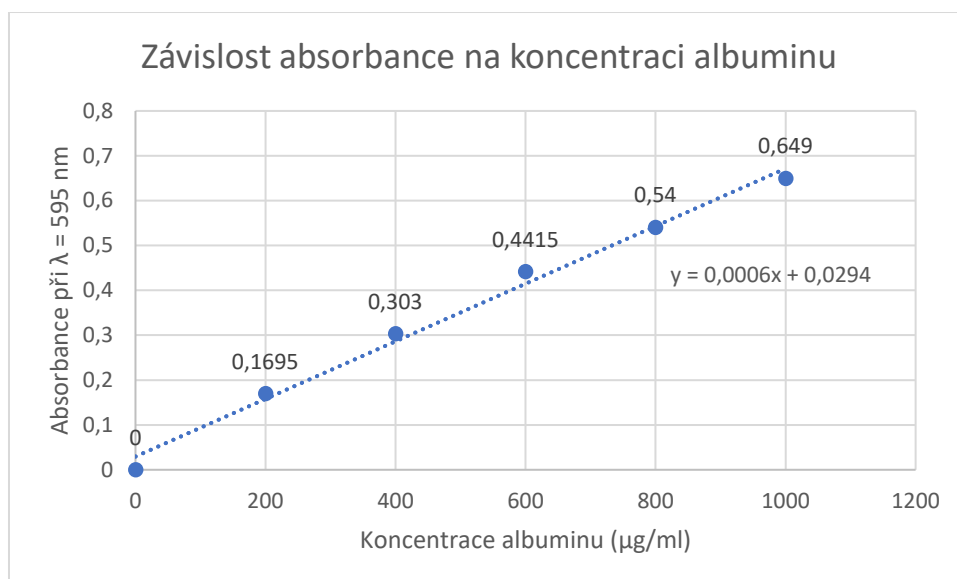
Postup:

1. Nejprve jsme za pomoci lidského albuminu, který se používá jako standard, připravili kalibraci.
2. Do 5 zkumavek jsme naředili albumin fosfátovým pufrům na koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, 800 $\mu\text{g/ml}$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$.
3. Do všech 5 zkumavek jsme přidali 5 ml Coomassie Brilliant Blue G250 a změřili absorbanci při vlnové délce 595 nm. Výsledné hodnoty absorbance jsme vynesli do grafu a vytvořili kalibrační přímku a rovnici, na základě které jsme poté spočítali koncentraci našich vzorků.
4. Naše 3 vzorky jsme získali odpipetováním 0,1 ml vzorku se zákalem 90 %, 80 % a 70 %.
5. K našim vzorkům jsme přidali 5 ml Coomassie Brilliant Blue G250 a změřili při vlnové délce 595 nm. Koncentrace bílkovin u jednotlivých vzorků jsme dopočítali na základě rovnice z kalibrace.

Výsledky:

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

Zkumavka č.	Koncentrace albuminu ($\mu\text{g/ml}$)	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

<i>Bacillus subtilis</i>					
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:

Hmotnost bakteriální sušiny *Bacillus subtilis* je při zákalu 90 % v průměru 0,60 mg/ml, při zákalu 80 % 1,50 mg/ml a při zákalu 70 % 7,00 mg/ml. Rozdíly hodnot mezi 1. a 2. skupinou mohou být způsobeny nepřesným pipetováním kultury do váženek nebo nepřesným vážením. Koncentrace bílkovin stanovená na základě metody Bradfordové je při 90% zákalu 130,167 µg/ml, při 80% zákalu 74,334 µg/ml a při 70% zákalu 48,500 µg/ml. Rozdíly hodnot mezi skupinami mohou být způsobeny opět nepřesným pipetováním vzorku.