

ROZTOKY

1. Činidlo

- **A**

12,5 g $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rozpustíme ve 125 ml bidestilované vody;
0,5 g $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ rozpustíme ve 20 ml bidestilované vody;
Oba tyto roztoky důkladně promícháme a doplníme 4,5M H_2SO_4 do objemu 500 ml.
Uchováváme v tmavých lahvích při teplotě 4 °C.

- **B**

50 g L-askorbové kyseliny rozpustíme ve 300 ml bidestilované vody, přidáme 250 ml 4,5M H_2SO_4 , doplníme bidestilovanou vodou do objemu 1000 ml.
Uchováváme v tmavých lahvích při teplotě 4 °C.

- **alkalické**

1000 ml A + 20 ml B + 20 ml C smícháme pro vytvoření alkalického činidla.

Roztok A: 60 ml 1M NaOH

50 g Na_2CO_3 (bezvodý)

doplníme do 1000 ml destilovanou vodou

Roztok B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

100 ml destilované vody

Roztok C: 1 g vinanu sodno-draselného ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) rozpustit ve 100 ml destilované vody.

- **Coomassie Brilliant Blue G 250**

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G250

50 ml etanol (96%)

100 ml kyselina ortofosforečná (85% w/v)

Doplnit do 1000 ml destilovanou vodou

- **Folin-Ciocalteu (33%)**

167 ml Folinova činidla doplníme do 500 ml destilovanou vodou.

Toto činidlo je nestabilní, je nutné připravit vždy čerstvé a uložit při 4 °C.

- **ke stanovení $\text{NH}_4\text{-N}$**

Roztok A: 0,66 g bromkrezolové zeleně a 0,33 g metylčerveně rozpustíme v 1000 ml 95% etanolu

Roztok B: 40 ml roztoku A přidáme k 400 ml 95% etanolu do odměrné baňky o objemu 2 litry. Potom smícháme 40 g kyseliny borité se 1400 ml teplé destilované vody. Vytvořený roztok vychladíme a přilijeme do odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce alkalizujeme 0,05 M NaOH tak dlouho, dokud se odebraný růžově zbarvený vzorek o objemu 1 ml nezbarví na světle zelený přidávkem 1 ml destilované vody. Takto upravený roztok doplníme destilovanou vodou do objemu 2000 ml.

- **ke stanovení redukujících cukrů I**

Činidlo A: 16 g bezvodého uhličitanu sodného a 0,9 g kyanidu draselného rozpustíme v 1000 ml destilované vody.

Činidlo B: 0,5 g hexakyanid železito- draselný $K_3Fe(CN)_6$ a zředíme v destilované vodě 1000 ml. Uchováváme v tmavé láhvi.

Činidlo C: 1,5 g síran železito-amonný, 1g SDS (sodium dodecyl sulfát) a 4,2 ml koncentrované kyseliny sírové doplníme teplou destilovanou vodou (50°C) do 1000 ml.

- **ke stanovení redukujících cukrů II**

Roztok I: 15 g vinan sodnodraselný a 30 g Na_2CO_3 rozpustíme v 300 ml destilované vody.

K vytvořenému roztoku přidáme 20g $NaHCO_3$.

Roztok II: 180 g Na_2SO_4 rozpustíme v 500 ml destilované vody. Rozpuštěný vzduch odstraníme z roztoku varem. Roztok necháme vychladnout při pokojové teplotě.

Roztok III: roztok I a roztok II smícháme a doplníme do 1000 ml destilovanou vodou.

Roztok IV: 5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a 45 g Na_2SO_4 rozpustíme v 250 ml destilované vody.

Roztok V: jeden díl roztoku III a 1 díl roztoku IV.(připravuje se těsně před použitím!)

2. DMA (defined medium anorganic)

0,875 g K_2HPO_4

0,475 g NaH_2PO_4

0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,01 g $CaCl_2$

2,0 g NH_4Cl

1000 ml vodovodní vody;

Sterilizace 150 kPa 20 minut.

3. Extraktant TCA-fosfát-paraquant

Roztok A: 81,6 g TCA (trichloroctová kyselina)

89,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$

600 ml destilovaná voda

Roztok B: 25,8 g paraquant (1,1-dimetyl-4,4bipyridylium chlorid)

100 ml destilovaná voda

smíchat roztok A (600 ml) a B (100 ml)

4. Fyziologický roztok

8,5 g $NaCl$

1000 ml destilované vody

Upravit pH na 4,25

5. Kaseinát sodný (2%)

10 g kaseinátu sodného přidáme do teplé destilované vody (50 °C). Umístíme na magnetickou míchačku a doplníme destilovanou vodou na objem 500 ml.

Jestliže máme k dispozici pouze kasein, rozpustíme 10 g kaseinu v Tris-HCl puftru, upravíme hodnotu pH na 8,1 přidávkem NaOH a doplníme do 500 ml 0,05M Tris-HCl pufrem (pH=8,1).

6. (KM) kultivační médium

20 g Pepton
3 g Beef extract
1000 ml destilované vody
Sterilizace při 200 kPa 20 minut.

7. LB-agar

10 g Trypton
5 g Yeast extract
5 g NaCl
20 g agar-agar
rozpusťt v 1000 ml destilované vody, před přidáním agaru upravit pH na 7,3
Sterilizace při 250 kPa po dobu 20 minut.

8. LB-médium

10 g Trypton
5 g Yeast extract
5 g NaCl
rozpusťt v 1000 ml destilované vody, upravit pH pomocí 1M NaOH na 7,3
Sterilizace při 250 kPa po dobu 20 minut.

9. M9 (minimální médium)

7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3 g KH_2PO_4
1 g NH_4Cl
0,5 g NaCl
4 g glukóza
0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,02 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
do 1000 ml doplnit demineralizovanou vodou

10. MEA (malt extract agar)

Připravit MEB
20 g agar-agar
Sterilizace při 120 kPa po dobu 10 minut.

11. MEB (malt extract broth)

17 g Malt extract
3 g Pepton
1000 ml destilované vody
Upravit pH na 5,4
Sterilizace při 120 kPa 10 minut.

12. Močovina (0,2 M)

1,2 g močoviny rozpustíme přibližně v 80 ml 0,05M Tris-HCl pufru (pH=9,0), doplníme tímž pufrem do objemu 100 ml. Roztok připravujeme vždy čerstvý a uchováváme během dne při teplotě +4°C.

13. MPA1 (masopeptonový agar č. 1)

5 g NaCl
3 g Beef extract
5 g Pepton
20 g agar-agar
1000 ml destilované vody
Sterilizace při 200 kPa 20 minut.

14. MPB1 (masopeptonový bujon č.1)

5 g NaCl
3 g Beef extract
5 g Pepton
1000 ml destilované vody
Upravit pH na 7,2
Sterilizace při 200 kPa 20 minut.

15. MPB konc. (masopeptonový bujón koncentrovaný)

3 g Beef extract
10 g Pepton
100 ml destilované vody
Upravit pH na 7,2
Sterilizace při 200 kPa 20 minut.

16. Oxaloctová kyselina

2 mg kyseliny oxaloctové do 1 ml 0,1M fosfátového pufru (pH = 7,5)

17. Pufr

- **acetátový (2M,pH 5,5)**

164,8g octanu sodného (bezvodý) rozpustíme ve 700 ml destilované vody. Zředěnou kyselinou octovou upravíme hodnotu pH na 5,5 a doplníme objem na 1000 ml.

- **acetátový (0,1M,pH 5,5)**

13,6g octanu sodného (tetrahydrát)) rozpustíme ve 700 ml destilované vody. Zředěnou kyselinou octovou upravíme hodnotu pH na 5,5 .Poté přidáme 2 g azidu sodného a doplníme objem na 1000 ml.

Kys. Octová (ml)	Octan (ml)	pH
46,3	3,7	3,6
44	6	3,8
41	9	4
36,8	13,2	4,2
30,5	19,5	4,4
25,5	24,5	4,6
20	30	4,8
14,8	35,2	5
10,5	39,5	5,2
8,8	41,2	5,4
4,8	45,2	5,6

Pozn.: Pufr sestává z roztoku 0,2M kys. octové a 0,2M octanu sodného. 0,1M pufr připravíme smícháním uvedeného množství složek a doplníme do 100 ml vodou.

- **borátový (pH=10)**

56,85 g tetraborátu dvojsodného nebo 30 g tetraborátu dvojsodného (bezvodý) v 1500 ml teplé destilované vody. Po ochlazení upravíme hodnotu pH na 10 pomocí 20% NaOH a doplníme na objem 2000 ml destilovanou vodou.

- **citrátový**

42 g kyselina citronová
 16 g NaOH
 900 ml destilované vody
 Upravit na pH = 5,0 přidavkem 10M NaOH

- **EDTA-magnesium arzenátový**

Roztok A: 31,2 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v 800 ml destilované vody
 10 ml 0,2 M EDTA (tetra sodium)

Roztok B: 2,46 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 100 ml destilovaná voda

(pH upravit 1M H_2SO_4 na hodnotu 7,4)
 smíchat roztoky A (800 ml) a B (100 ml) a doplnit na objem 1000 ml destilovanou vodou

• **fosfátový 0,067M**

0,067M KH_2PO_4 (ml)	0,067 M Na_2HPO_4 (ml)	pH
9	1	5,91
8	2	6,24
7	3	6,47
6	4	6,64
5	5	6,81
4	6	6,98
3	7	7,17
2	8	7,38
1	9	7,73
0,5	9,5	8,04

Pozn.: 0,067 M roztok KH_2PO_4 připravíme rozpuštěním 9,078 g soli v 1000 ml redestil. vody.
0,067 M roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ připravíme rozpuštěním 11,876 g soli v 1000 ml redestil. vody.

Sterilizace při 200 kPa 20 minut.

• **fosfátový 0,1 M (pH = 7,5)**

13,61 g KH_2PO_4
22,82 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
1000 ml destilované vody

• **fosfátový 0,05 M (pH 7,2)**

1,431 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
0,549 g KH_2PO_4
rozpustit v 240 ml destilované vody

• **fosfátový 0,05M (pH= 8,0)**

50 ml 0,2 M KH_2PO_4
46,85 ml 0,2 M NaOH
doplnit destilovanou vodou na 200 ml

- **Tris-HCl (0,05M)**

0,05M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) pufr dle Gomoriho

HCl (ml)	pH
44,2	7,2
41,4	7,4
38,4	7,6
32,5	7,8
26,8	8
21,9	8,2
16,5	8,4
12,2	8,6
8,1	8,8
5	9

Pozn.: K 50 ml 0,2M roztoku TRIS přidáme uvedené množství 0,2M HCl a doplníme dest.vodou na 200 ml.

0,2M roztok TRIS připravíme rozpuštěním 24,2 g TRIS v 1000 ml destil. vody.

18. Roztok

- **arzenát-molybdenát**

25 g molybdenanu amonného rozpustíme ve 450 ml destilované vody. Přidáme po kapkách (za neustálého míchání) 25 ml koncentrované kyseliny sírové. Na závěr přidáme 25 ml $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g $\cdot 25 \text{ ml}^{-1}$ vody) a důkladně promícháme. Připravený roztok ponecháme 2 dny při 37°C v termostatu a přelijeme do tmavé láhve. Těsně před použitím smícháme 1 díl tohoto roztoku se dvěma díly 0,75 M H_2SO_4 .

- **dichloroizokyanid sodný (0,1%)**

0,1 g dichloroizokyanidu rozpustíme ve 100 ml destilované vody (*připravít těsně před použitím*)

- **KCl**

74,6 g KCl rozpustíme v destilované vodě a přidáme 10 ml 1 M HCl (32% HCl odpovídá 10M HCl). Doplníme destilovanou vodou na 1000 ml.

- **ke stanovení ureázy [2,5M KCl + síran stříbrný (100 mg.l⁻¹)]**

100 mg Ag_2SO_4 v 700 ml destilované vody. Ve vytvořeném roztoku rozpustíme 188 g KCl a doplníme do 1000 ml destilovanou vodou.

- **KMC (roztok karboxymetyl celulózy)**

Příprava 0,7%(w/v) roztoku: 7 g KMC (sodná sůl) rozpustíme v 1000 ml acetátového pufru a mícháme při teplotě 45°C po dobu 2 h. Vzniklý roztok musí být uchováván v chladu při +4°C, nejdéle po dobu jednoho týdne.

- **NaHCO₃**

42 g NaHCO₃ rozpustíme v 900 ml destilované vody a upravíme pH na hodnotu 8,5 pomocí 10M NaOH. Doplňme do 1000 ml destilovanou vodou.

- **salicylátu sodného**

17 g salicylátu sodného rozpustíme v destilované vodě. Přidáme 120 mg nitroprussid sodný a doplníme destilovanou vodou do 100 ml.

- **stimulační**

39 mg Yeast extract

58,5 mg NH₄Cl

15,6 mg MgSO₄ · 7H₂O

13 mg KH₂PO₄

rozpusťte a doplňte na objem 160 ml destilovanou vodou

19. Standard

- **ATP (10⁻³M)**

6,23 mg ATP (disodium)

7,0 ml pufr EDTA-magnesium arzenátový

- **ke stanovení ninhydrin-reaktivního dusíku**

10mM L-leucin (1,312 g/l)

10mM NH₄-N (0,661 g (NH₄)₂SO₄ /l)

Roztoky jsou připraveny odděleně v 0,5M K₂SO₄ a ředěny v rozsahu 0-1000 μM NH₄-N

- **NH₄-N (50μg NH₄-N ml⁻¹)**

0,234 g síranu amonného rozpustíme v 1000 ml destilované vody.

- **NH₄-N (I + II)**

Roztok I:

3,82 g chloridu amonného rozpustíme v destilované vodě a doplníme v destilovanou vodou na objem 1000 ml (1000 mg NH₄-N ml⁻¹). Roztok je stabilní po dobu několika týdnů při teplotě +4°C.

Roztok II:

Pipetujeme 0,0, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ml roztoku I do odměrných baněk (100 ml) a doplníme do 100 ml roztokem KCl.

- **tyrozin**

50 mg tyrozinu rozpustíme ve 100 ml 0,05M Tris-HCl pufru (pH=8,1).

20. TA (tryptonový agar – 2%;0,7%)

10 g Trypton
4 g Yeast extract
3 g NaCl
20 g agar-agar (pro přípravu 0,7% TA navážíme 7 g agar-agar)
Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml
Sterilizace 150 kPa 20 minut.

21. TB (tryptonový bujón)

10 g Trypton
4 g Yeast extract
3 g NaCl
Doplnit destilovanou vodou do 1000 ml
Sterilizace 150 kPa 20 minut.

22. Trichloroctová kyselina (15%)

75 g trichloroctové kyseliny (TCA) rozpustíme přibližně v 300 ml destilované vody a doplníme destilovanou vodou do 500 ml.

23. Tween 80

1% emulze polyoxyetylen sorbitan monooleátu v 0,05M Tris-HCl pufru
Homogenizujeme roztřepáním do vytvoření stabilní emulze

24. YE konc. (yeast extract koncentrovaný)

2 g Yeast extract
100 ml destilované vody
Upravit pH na 7,2
Sterilizace 150 kPa 20 minut.