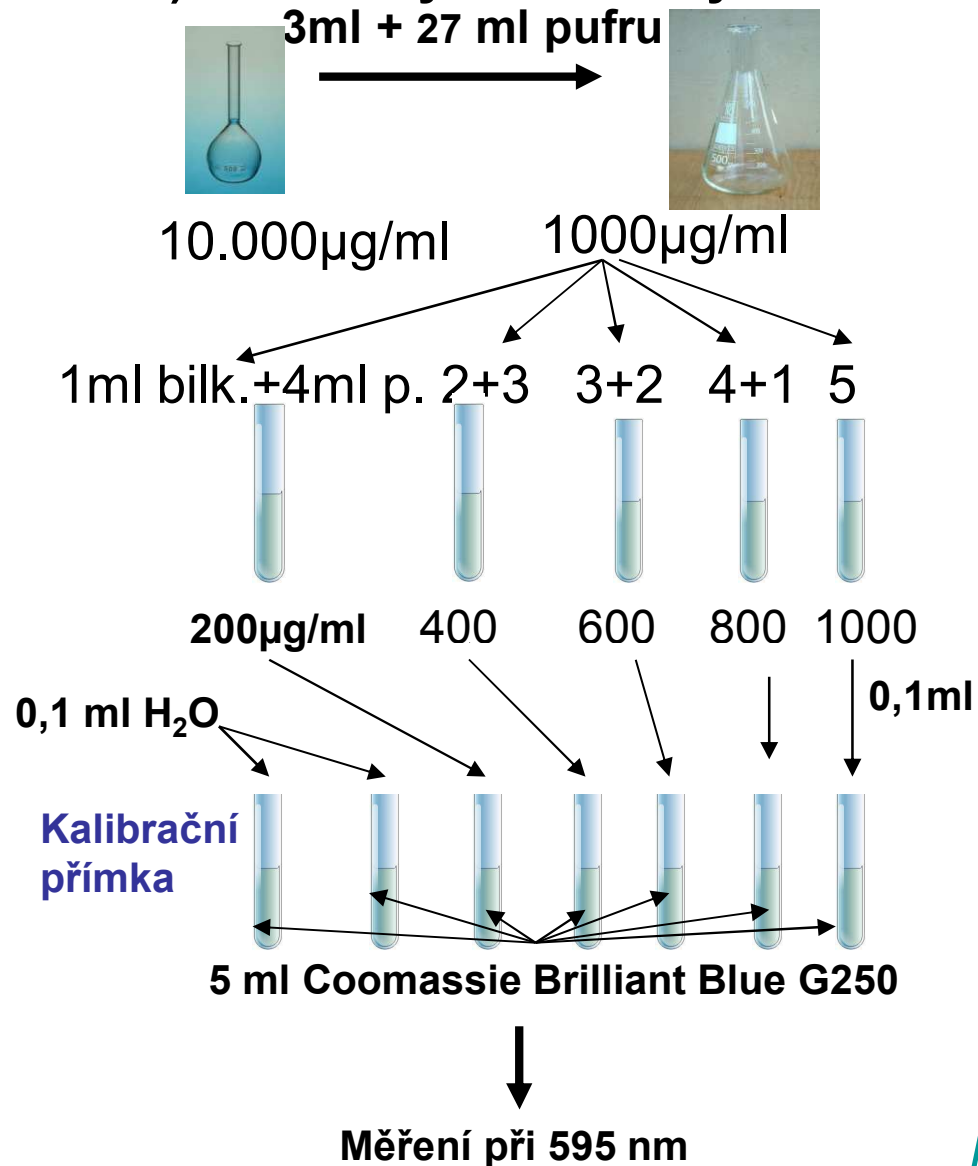


Stanovení bílkovin dle Bradfordové a stanovení sušiny

1) 24 hod. kulturu zcentrifugujeme a 2x promyjeme fosfátovým pufrům

2) Standardy – bílkoviny



Příprava vzorků pro měření sušiny a koncentrace bílkovin

- resuspendovat promytou kulturu v malém množství (několika ml) f. pufru
- cca polovinu odlít do erlenky a ředit na zákal:

95% - sušina (T=5)

90% - sušina, bílkoviny

85% - sušina

75% - sušina

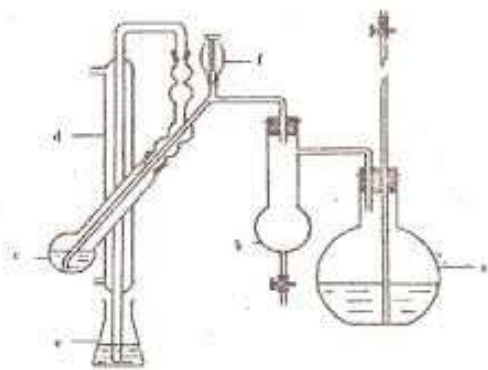
Přesnou hodnotu zapiš!!!

Měřím na Spekolu 11 při 620 nm

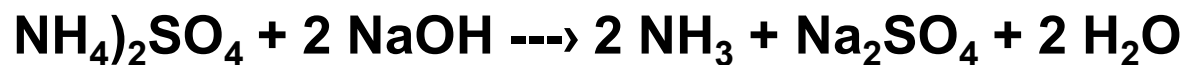
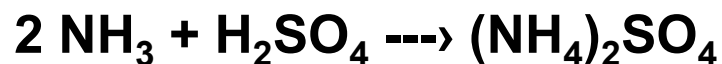
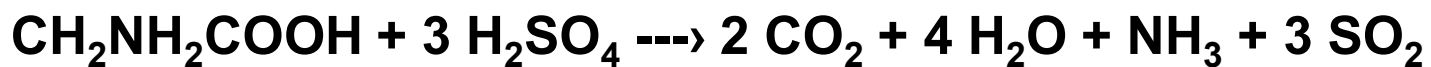
- Ze vzorků na určení sušiny pipetuji PŘESNĚ 2 ml do předem zvážených váženek (+pufr) – dám do sušárny 106°C
- po 24 h váženky přijít zvážit!!!!

Porovnat kultury (obsah bílkovin na sušinu), určit vztah mezi zákalem a sušinou

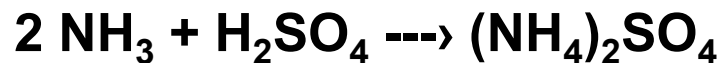
Kjeldalova metoda



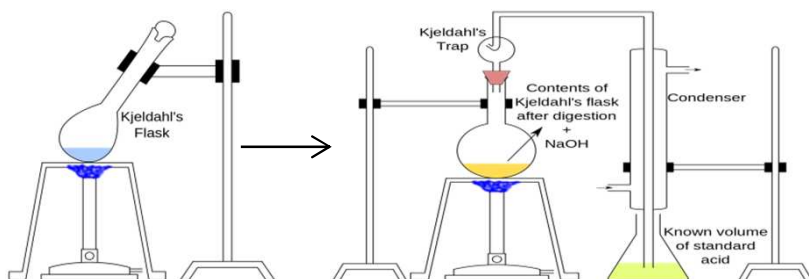
Po mineralizaci organické dusíkaté látky varem s koncentrovanou kyselinou sírovou a peroxidem vodíku se dusík přítomný ve formě různých funkčních skupin převede na amoniak, který zůstane vázán ve formě síranu amonného, alkalizací se ze síranu uvolní a stanoví se titračně



Vytěsněný amoniak je jímán v předloze do známého množství 0,05 M H_2SO_4



Titruje se nezreagovaný zbytek odměrného roztoku kyseliny sírové odměrným roztokem 0,1 M NaOH do slabě cibulového zabarvení



Současné metody stanovení koncentrace (kvantifikace) proteinů

Velmi důležitá analýza bez drahých instrumentů

Dnes se preferují spektrofotometrické metody

Biuretová metoda

reakce peptidové vazby s $\text{Cu}^{(II)}$ v alkalickém prostředí

Tvoří se modrofialové zbarvení, $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$

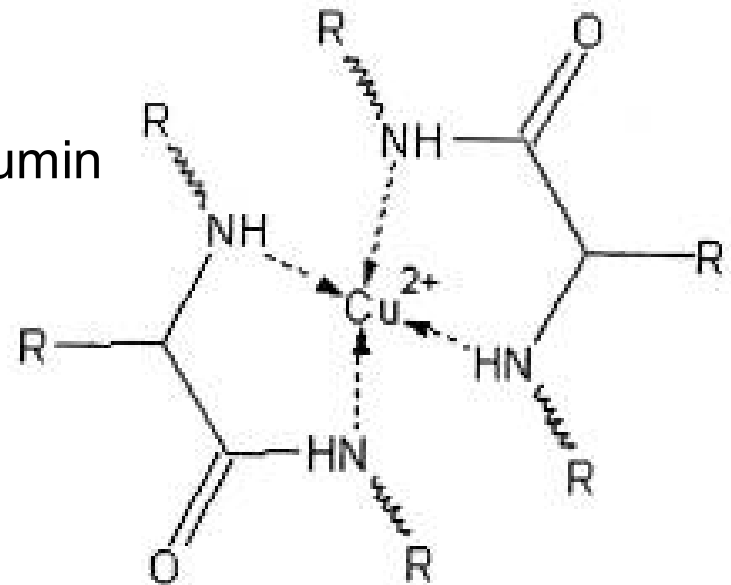
Činidlo obsahuje CuSO_4 , vínán sodno-draselný a NaOH

Metoda nezávisí na aminokyselinovém složení

je málo citlivá (cca **10 - 100 mg/mL**)

Ruší např. NH_4^+ , Tris

Kalibrace na standardy sérový albumin, ovalbumin



Lowryho metoda

Lowryho metoda mnohem více závisí na složení proteinu. K reakci peptidové vazby s Cu^{2+} přispívá **redukce fosfomolybdenanů a fosfowolframanů tyrosinem** (ale i tryptofanem a cysteinem). Principem je nejprve provedení biuretové reakce a pak přidavek Folinova činidla (fenlové činidlo)

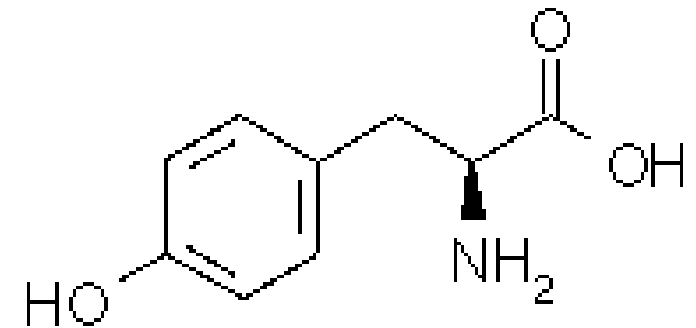
Měří se při 650 – 750 nm

Vyšší citlivost než biuretová reakce (**2-100 mg/ml**)

Zbarvení není v čase stabilní

Ruší např. NH_4^+

Kalibrace na standardy sérový albumin, ovalbumin



tyr y Tyrosin

BCA metoda; od 1985, citlivost 0, 5 mg/ml,

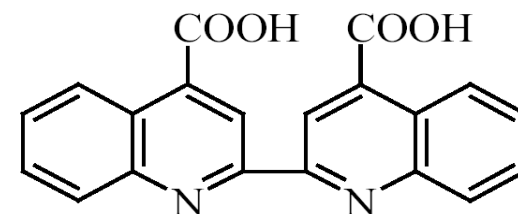
využívá sodné soli kyseliny bichinoninové (BCA), která **komplexuje ionty Cu(I)** tvořené reakcí peptidové vazby s Cu(II). Činidlo se připravuje smísením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí (100 dílů) a CuSO₄ (1 díl)

Měří se při 562 nm

Citlivost na úrovni Lowryho metody

mmenší interference (NH₄⁺ ano)

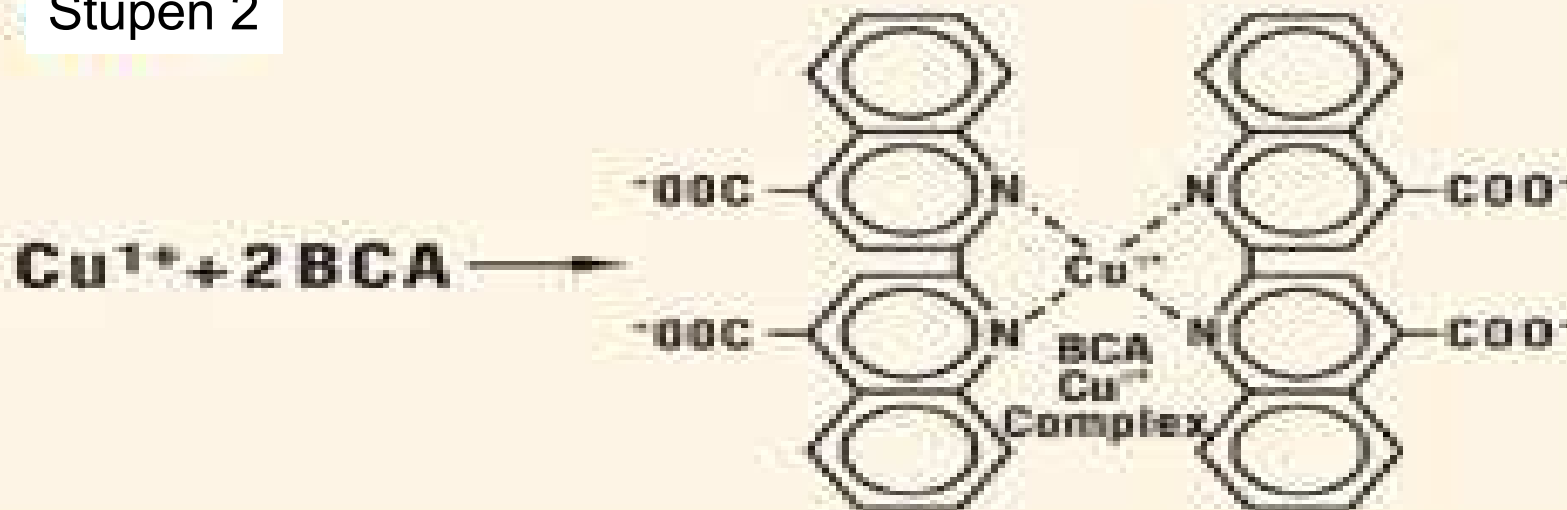
Kalibrace na standardy sérový albumin, ovalbumin



Stupeň 1



Stupeň 2



Metoda Bradfordové (5 min),

principem je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu

Citlivost 1 mg/ml

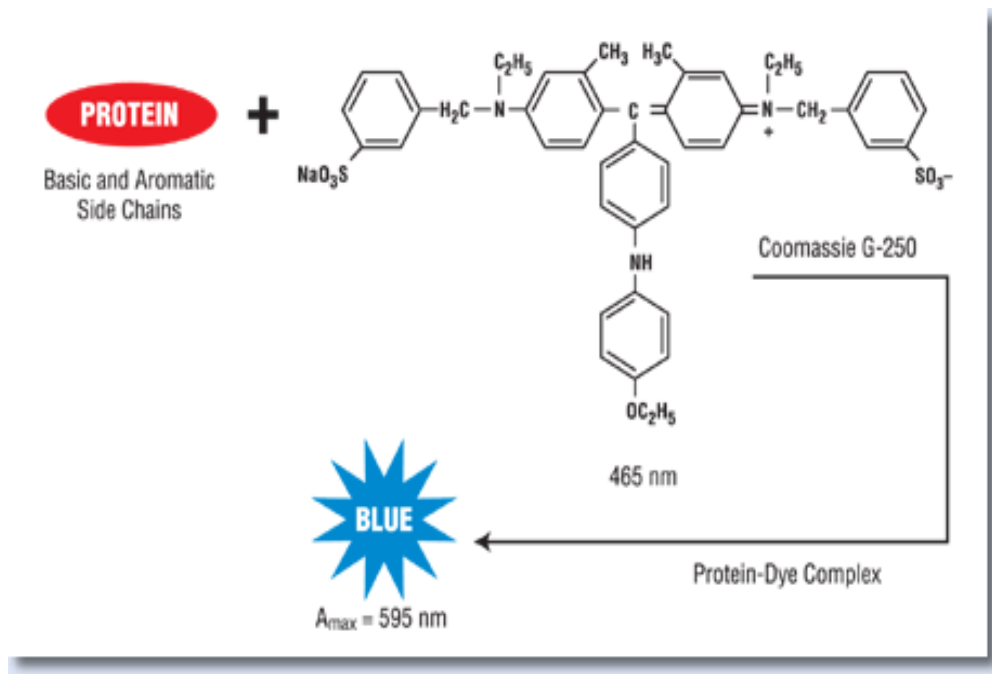
Závisí na obsahu bazických (zvl. Arg), ale i aromatických aminokyselin

Množství látek však interferuje, negativně zejména detergenty (SDS, Triton)

Nedává tedy tak spolehlivé výsledky jako obdobně citlivá BCA metoda, kde tyto látky neruší

Citlivost je 5 x vyšší než u Lowyho metody, lineární kalibrace max. po 20 mg proteinu. Linearita 125 -1 500 μ g

Činidlo (vodný roztok) obsahuje barvivo, etanol a H₃PO₄. Barva hnědá, po reakci s proteinem intenzivně modrá, $\lambda_{\max} = 595$ nm



Pozor

Barví skleněné a křemíkové kyvety !!

Přímá spektrofotometrická stanovení (UV oblast)

díky přítomnosti chromoforů v molekulách proteinů, které absorbují v UV oblasti spektra

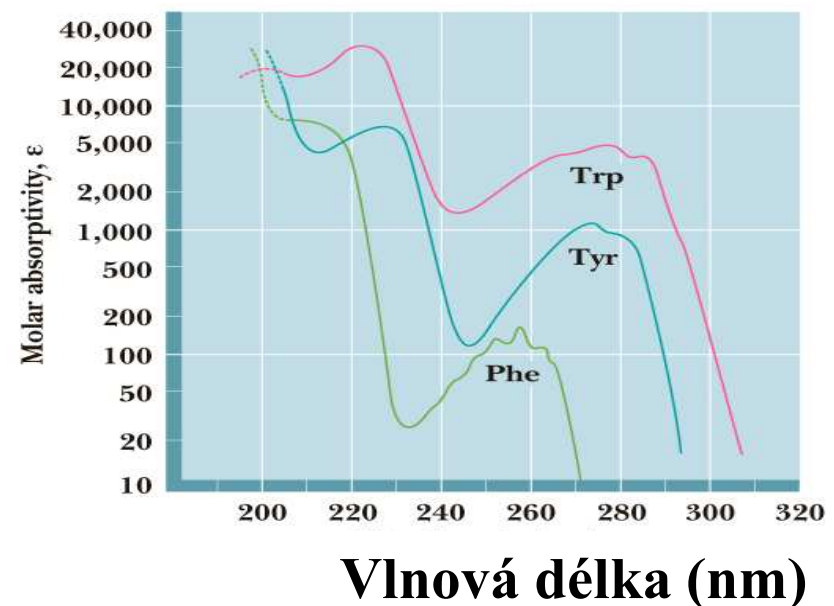
Velkou výhodou je, že jde o nedestruktivní metodu. Pracuje se s křemennými květami, nikoli sklo ani plast

V blízké UV oblasti (280 nm) není velká citlivost – 50 mg / mL, v daleké UV oblasti (205 nm) pak dochází ke značné interferenci

Samozřejmě je zde **velká závislost na aminokyselinovém složení proteinu**. Vzhledem k tomu, že UV absorpce je dána aromatickými AK (hlavně Trp a Tyr), je nutná jejich přítomnost

Interference širokého absorpčního pásu nukleových kyselin (λ_{\max} = 260 nm) se eliminuje měřením při dvou vlnových délkách a početní korekcí.

V daleké UV oblasti se využívá vlnová délka 205 nm (maximum absorpce peptidové vazby je při 192 nm).



Fluorescenční stanovení

fluorimetrické stanovení proteinů je založeno **na reakci primárních aminoskupin v proteinu (Lys, N-koncová aminoskupina) s o-ftalaldehydem**

Citlivost metody může být zvýšena hydrolýzou proteinů před měřením

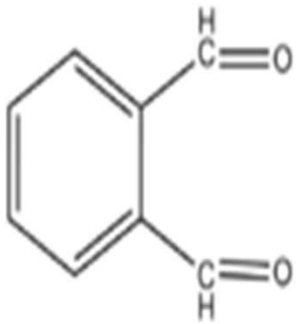
Ruší pufrы s obsahem primárních aminoskupin (Tris), nejlépe použít borátový pufr (pH 10.4)

Měří se po přidavku hydroxidu sodného

excitační vlnová délka 340 nm

emise mezi 440 a 455 nm

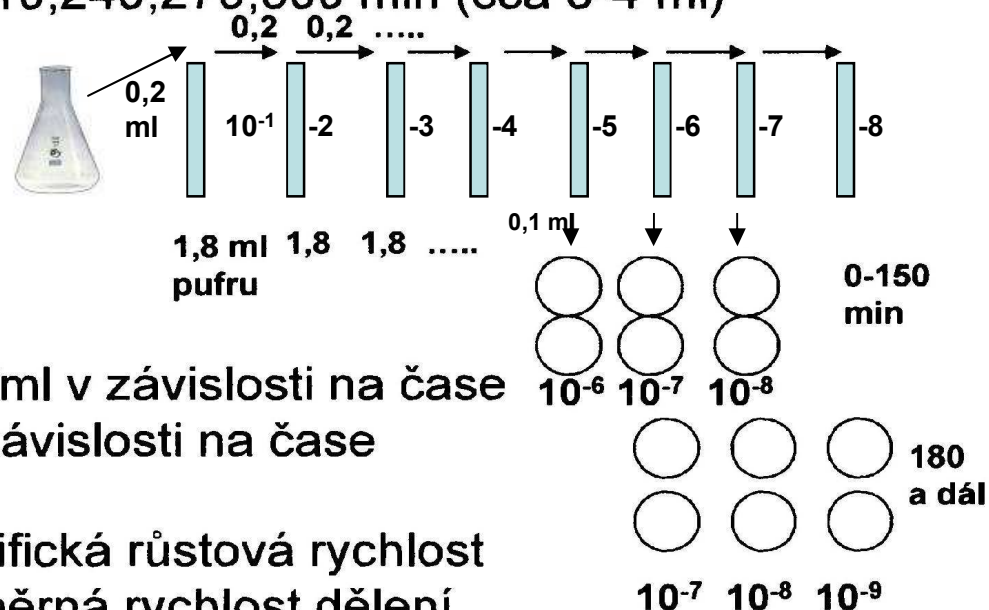
Každý vzorek se měří pouze jednou, ozáření snižuje intenzitu fluorescence.



Růstová křivka bakteriálních buněk

Salmonella typhimurium LB 5000

- 1 klička ze šikmého agaru do 10 ml L- media
- kultivace 12h při 37°C - staticky
- 2 ml do 100 ml L-media
- 37°C, třepat ve vodní lázni (150 kyvů/min)
- odběry: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 min (cca 3-4 ml)
- výsev 0,1 ml na misky s L-agarem
 - 0-150 min: 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}
 - 180-300 min: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
- měření OD_{620} (proti L-mediumu)



- Sestrojit růstovou křivku - log CFU/ml v závislosti na čase
 - OD_{620} v závislosti na čase
- Výpočet růstových konstant – specifická růstová rychlost
 - průměrná rychlost dělení
 - generační doba
 - doba lagu

Počet buněk po n-tém dělení (n generace)

$$x_n = 2^n \cdot X_0$$

V čase t potom

$$t = nT, \text{ kde}$$

n – počet zdvojení za dobu t-t₀, T doba potřebná k rozdělení buňky

Dosadíme-li za n=t/T do rovnice

$$x_n = 2^n \cdot x_0$$

Bude se **počet buněk** v závislosti na čase rovnat

$$x = x_0 2^{t/T}$$

Počet generací n v čase lze vypočítat i použitím dekadických logaritmů

$$\log x = \log x_0 + n \log 2$$

Průměrná rychlost dělení – R (n se vztáhne na dobu růstu populace)

$$R = \frac{n}{t} = \frac{1}{\log 2} \cdot \frac{\log x - \log x_0}{t - t_0}$$

střední generační doba τ

$$\tau = \frac{1}{R} = \log 2 \cdot \frac{t - t_0}{\log x - \log x_0}$$

specifická růstová rychlost μ

(růstová rychlost přepočtená na jednu buňku nebo biomasu)

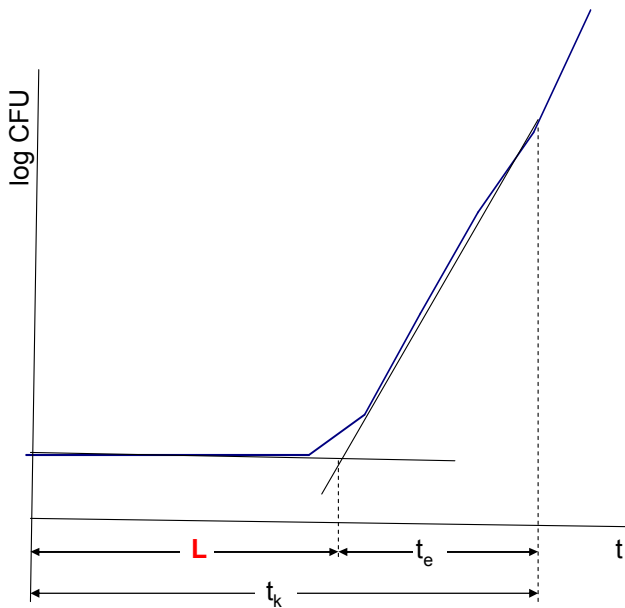
$$\mu = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{x} = \frac{\ln x \cdot \ln x_0}{t} = 2,3 \cdot \frac{\log x - \log x_0}{t - t_0}$$

doba lagu L

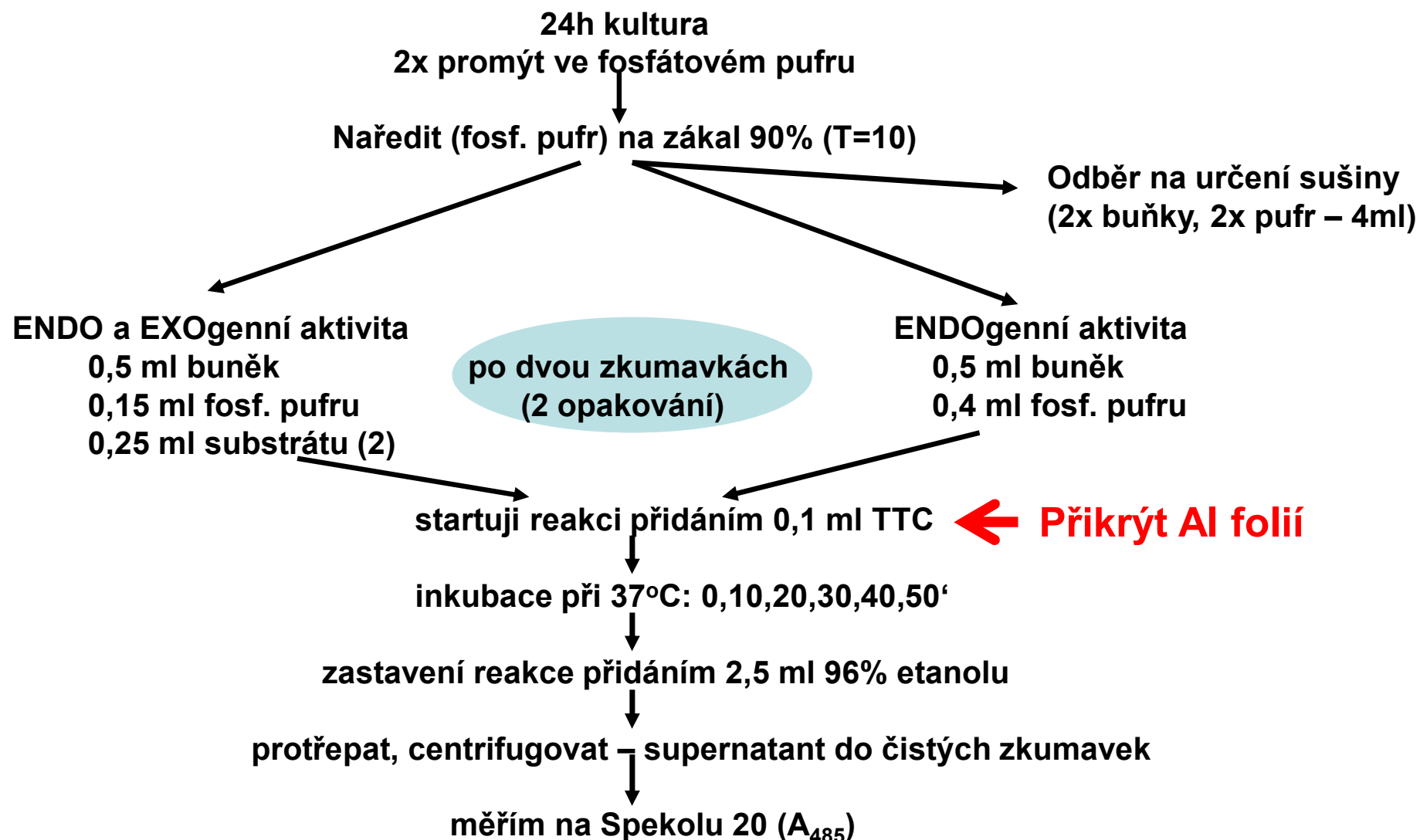
$$L = t_k - t_e$$

$$t_e = \frac{1}{\log 2} \frac{(\log N - \log N_0)}{R} = \frac{1}{\log 2} \tau (\log N - \log N_0)$$

t_k - doba trvání experimentu (experimentálně zjištěná)



Stanovení dehydrogenázové aktivity bakteriálních buněk



Dvojice si rozeberou testované mikroorganismy.

Pro každý pak dělám VŽDY glukózu + další substrát – pro ENDO a EXOgenní aktivitu plus bez substrátu pro ENDOgenní aktivitu - tedy dohromady 36 zkumavek

Reakce je citlivá na světlo –zakrývat alobalem

Křivka pro EXO a ENDOgenní aktivitu (ug formazabu/mg suš.), dehydrogenázová jednotka pro daný substrát

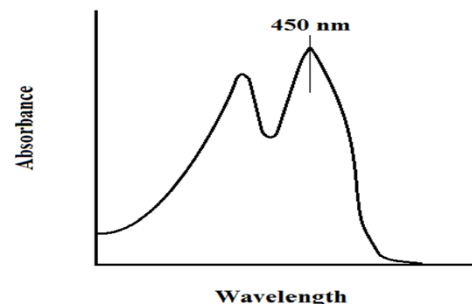
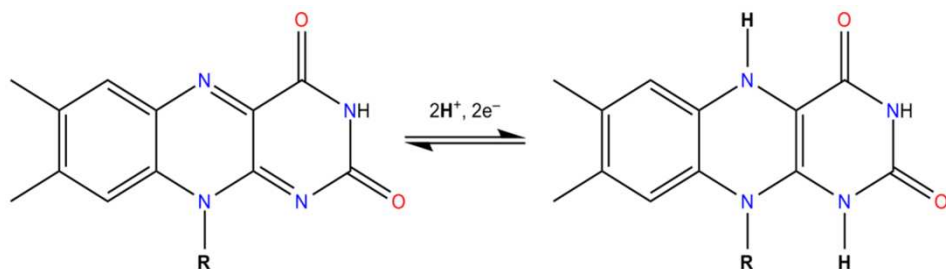
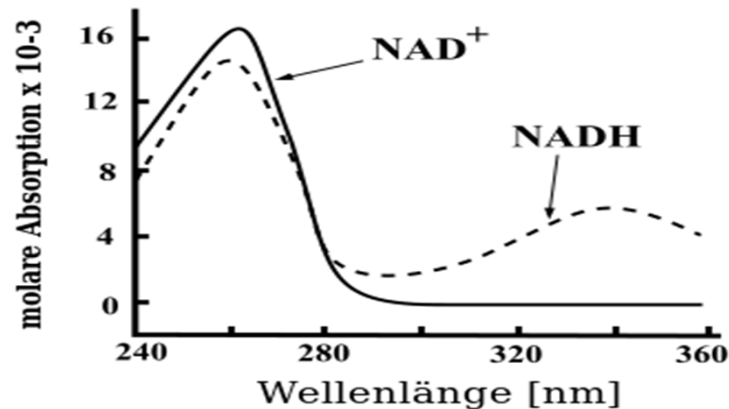
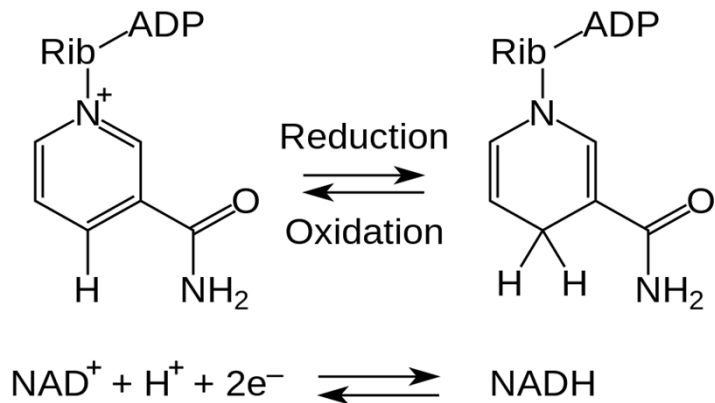
Přirozené akceptory vodíku a elektronů

Nejčastěji se používají koenzymové formy dehydrogenáz NAD a FAD

Spektrofotometricky se měří jedna forma

oxidovaná – úbytek

redukována - přírůstek



Umělé akceptory vodíku a elektronů

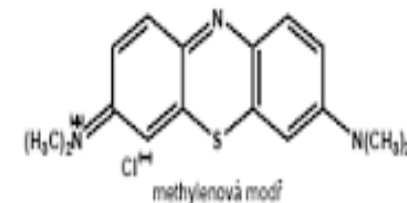
Jsou charakteristické přechodem z leukoformy na barevnou (nebo naopak) po připojení vodíku. Měření se provádí fotometricky

Metylenová modř

Většinou pro orientační testy nebo při Thumbergově metodě stanovení dehydrogenační aktivity. Metoda je založena na stanovení rychlosti odbarvování roztoku MM v přítomnosti donoru vodíku

Nevýhoda

musí se pracovat v anaerobních podmínkách
rychlá autooxidace
velká toxicita MM



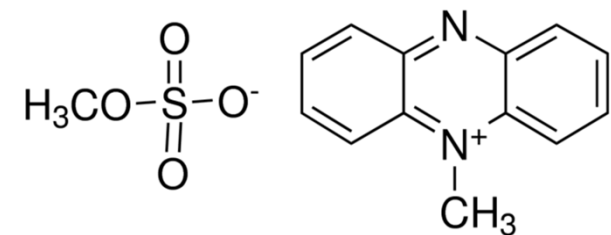
Fenazinmetosulfát

Je výborným akceptorem pro některé dehydrogenázy (laktát-, glycerol fosfát, NADH aj.)

Používá se především při manometrických metodách

Nevýhoda

musí se pracovat v anaerobních podmínkách
rychlá autooxidace
neenzymově redukuje cytochrom c, tetrazoliové soli



Tetrazoliové sloučeniny

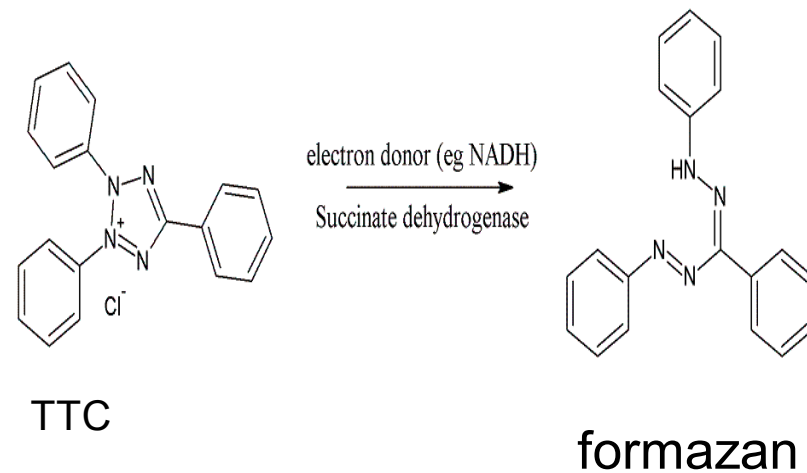
Se velmi často používají jako chlorid nebo bromid pro tzv. TTC test pro stanovení metabolické aktivity – dehydrogenázové aktivity – pro jejich malou toxicitu

TTC je bezbarvý, redukovaný červený (formazan)

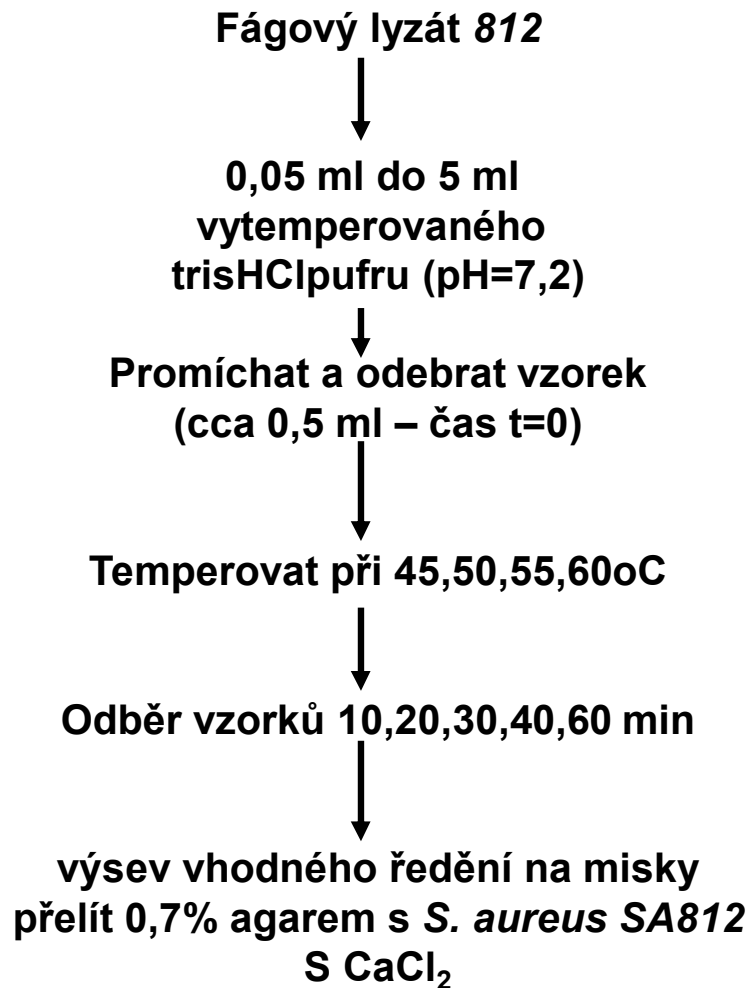
Reakce se zastavuje přidáním kyseliny octové, trichloroctové nebo organickými rozpouštědly (aceton, etanol, metanol)

Nevýhoda

citlivost na přímé světlo



Inaktivace fága teplem



Ředění

| čas | 45°C | 50°C | 55°C | 60°C |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| 0 | 2-3-4-5 | 2-3-4-5 | 2-3-4-5 | 2-3-4-5 |
| 10' | 3-4-5 | 2-3-4 | 1-2-3 | -1-2-3 |
| 20' | 3-4-5 | 2-3-4 | 0-1-2 | 0-1-2 |
| 30' | 3-4-5 | 2-3-4 | 0-1-2 | 0-1-2 |
| 40' | 3-4-5 | 1-2-3 | 0-1-2 | 0-1-2 |
| 60' | 3-4-5 | 0-1-2 | 0-1-2 | 0-1-2 |

Hodnocení: inaktivační přímka, výpočet k_i

$$K_i = \frac{2,3}{t} \cdot \log \frac{P_0}{P_t}$$

P_0 = pfu/ml v čase t=0
 P_t = pfu/ml v čase t

Indukce lyze buněk UV-zářením

Lyzogenní kmen *S. aureus*
S26 = NCTC 8511 (53+)
kultivace 24 h při +37°C

↓ 3 ml

200 ml
tryptonový bujon
kultivace
4 h při 37°C



10 ml ozářených buněk
5 ml konc. yeast extrakt
5 ml konc. bujonu
35 ml fyziol. roztoku



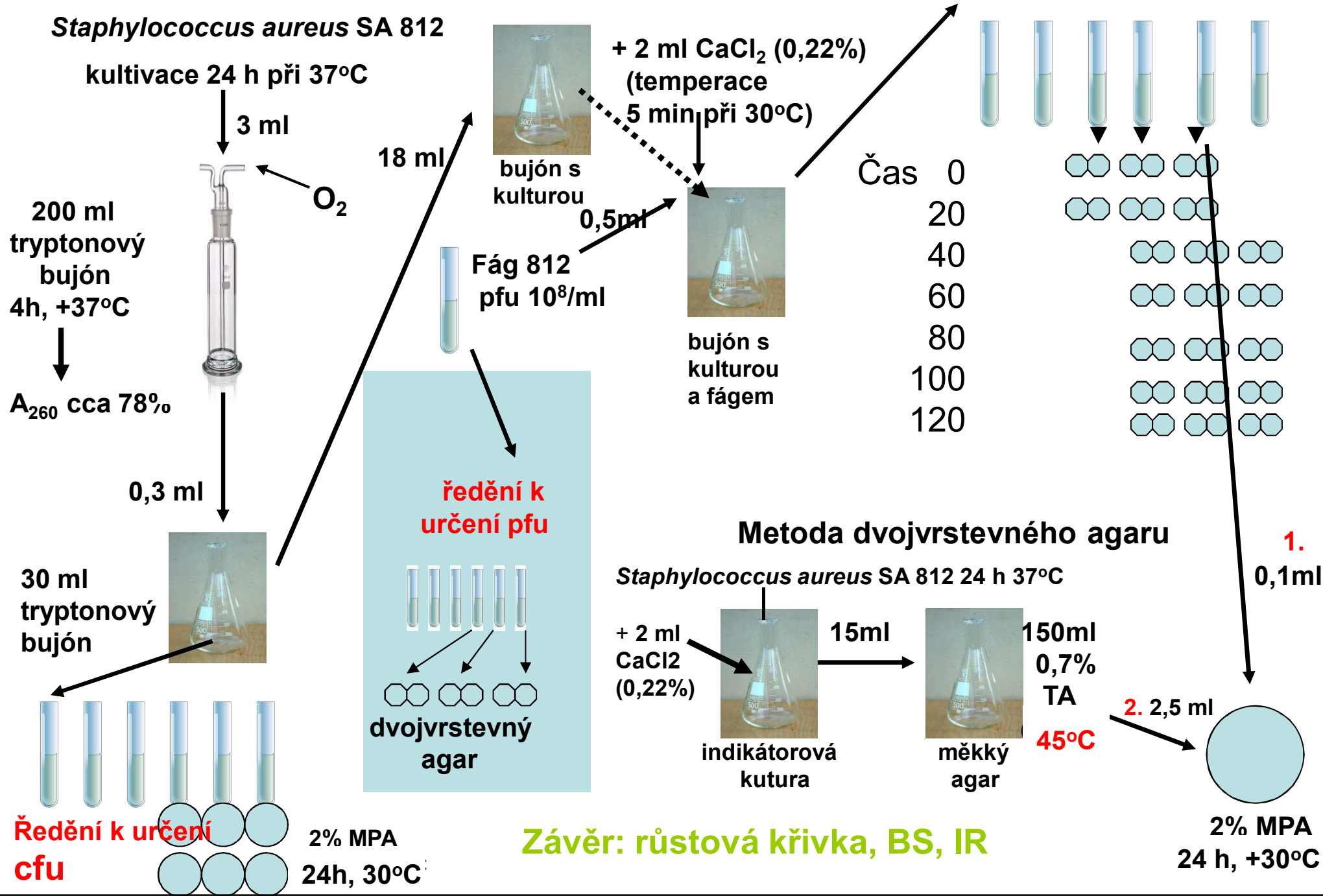
kultivace
cca 2h při +37°C
ve tmě !!!! (alobal)

-
- centrifugace 10.000 ot - 10 min.
sterilně
 - resuspendovat v 10 ml fosf.puftru
 - slít dohromady (homogenizace)
 - po 10 ml na sterilní petriho misky
 - ozařování UV – 30W, 60 cm
-30, 45, 60, 90, 120 sec.

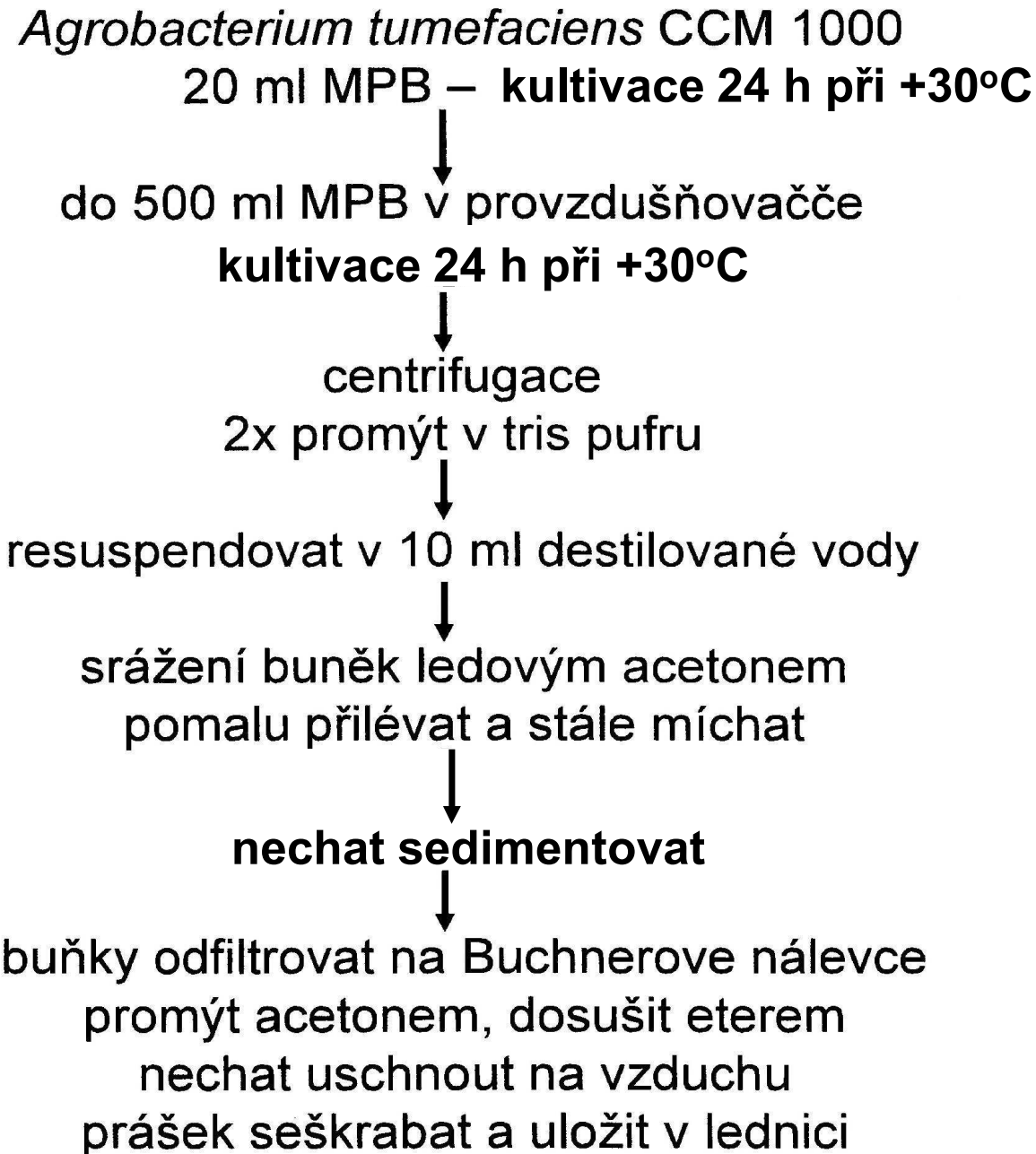
- titrace na indikátorovém kmeni
(metoda dvojvrstevného agaru)
NCTC8511 (53-) ředění 10⁻³ – 10⁻⁸
po dvou miskách

Závěr: tabulka a graf vlivu doby ozáření
Na počet uvolněných fágových částic

Růstová křivka fága SA 812



Příprava hrubého enzymového preparátu (acetonového prášku)



Stanovení fosfatázové aktivity nativních buněk a HEP

- 24h kultura buněk (CCM1000) – centrifugace a 2x promytí v Tris pufru
- resuspenduji v Tris pufru na zákal 80% (T=20), 620nm
- stanovím sušinu
- připravím roztok acetonového prášku (HEP): 2mg do 20ml Tris pufru
- zásobní roztok PNPP (4mg/ml) naředím na: 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/ml
- zkumavky s 0,6 ml Tris p. + 1 ml HEP/buněk dám temperovat – lázeň 40°C
- reakci nastartuji přidáním 0,2 ml PNPP příslušné koncentrace
- inkubuji 5-10 min (dle zbarvení)
- reakci zastavím přidáním 2ml 1M NaOH
- zkumavky s buňkami zcentrifuguji
- měřím zbarvení vzniklého PNP na Spekolu 20 – 400nm

| Koncentrace PNPP | 4 | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 mg/ml |
|----------------------|---|---|---|-----|------|-------------|
| 0,6ml Tris+1ml buněk | | | | | | |
| 0,6ml Tris+1ml HEP | | | | | | |
| 1,6 ml Tris | | | | | | |

Závěr: Výpočet K_m ; sestavení grafu závislosti rychlosti štěpení PNPP (nmol PNP/mg suš/min) na jeho koncentraci v reakční směsi

Fosfatázy

Patří do skupiny hydroláz. Štěpí fosfolipidy, fosfoproteiny, glycerofosfáty a další sloučeniny kyseliny fosforečné

Podle vztahu k substrátu

specifické k jednomu substrátu (fosfomonoesterázy, fosfodiesterázy, pyrofosfatázy, amidázy)

specifické pro více substrátů (adenozintrifosfáty, fytázy, polyfosfatázy, hexodifosfatázy, metadifosfatázy)

alkalické – optimální pH 7 – 8

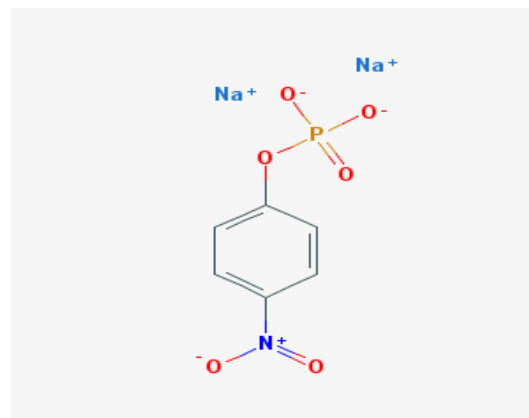
kyselé – optimální pH 3,4 – 4,2

Podle vazby v buňce – volné, vázané, slabě vázané

Kvantitativní stanovení – množství uvolněné látky z chromogenního substrátu.

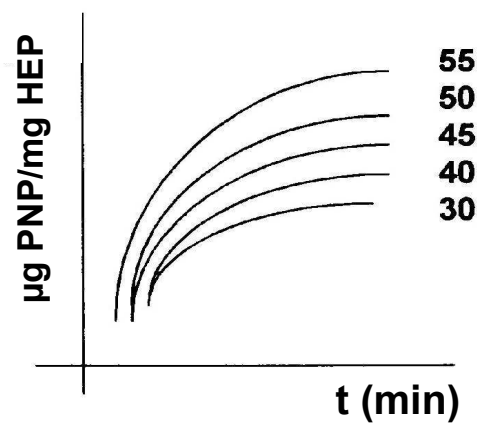
Substráty - p-nitrofenylfosfát, fenolftaleindifosfát

V případě p-nitrofenylfosfátu- množství uvolněného p-nitrofenolu

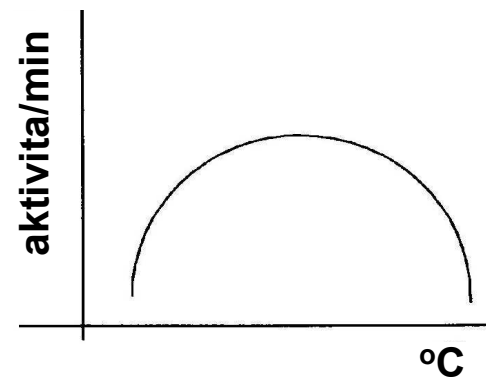


Vliv tepla na fosfatázovou aktivitu hrubého enzymového preparátu

- HEP do 100 ml Tris-HCl (cca 20 mg)
- 14 zkumavek ke každé teplotě (37, 40, 45, 50, 55°C): 0,6ml TrisHCl+1ml HEP
↙
+1 zk. – kontrola (10 min.)
- přidat 0,2 ml PNPP (2mg/ml)
- inkubovat 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10 min – zastavit 2ml 1M NaOH
- měřit intenzitu zbarvení na Spekolu 20 (400nm)



Z exponenciální části křivky
maximální aktivitu fosfatázy



Stanovení produkce secernovaných bílkovin

- 20 ml 48h kultury (*P. putida*) 30°C
s těžkým kovem

↓
- centrifugace



mokrý biomas – resuspenduji – stanovit bílkoviny
zvážit ve 20 ml pufru

- ↓
- 5 ml supernatantu
 - + NaCl (na špičku skalpelu)
 - + 45 ml 96% etanolu
 - pomalu přilévám a míchám
 - srážím 1h v ledové lázni
 - centrifugace
 - na dně sacharidy
 - na stěnách bílkoviny
 - sediment rozpustit (plast. tyčinka)
v 500µl 5M močoviny, 2M thiomočoviny
 - (centrifugace)
 - stanovit množství bílkovin
 - zbytek jde na HPLC Agilent 1100
 - kolona POROSHELL 300SB-C18
 - 2,1mmIDx75 mm (5 µm)
 - nástřik 100 µl, 60°C
 - průtok 0,5ml/min
 - mobilní fáze – 0,75% TFA v acetonitrilu
 - 1,0% TFA v demineralizované vodě
 - gradient 10-50% za minutu

Hodnocení

- stanovit množství bílkovin v 1g biomasy
- stanovit množství bílkovin v 1ml média
po kultivaci s těž. kovy (kontrola!!!)
- stanovit množství izolovaných bílkovin
- stanovit % zastoupení bílkovin v závislosti
na retenčním čase (sloupcový graf)
- produkce secernovaných bílkovin v závislosti
na přítomnosti těžkých kovů (sloupcový graf)

Vliv těžkých kovů na růst buněk *P. putida*

- 24h kulturu zcentrifugovat
- resuspendovat v bujónu M002 Oxoid (jen kapka – T= 95%)
- roztoky těžkých kovů – přidáním 10 μ l vznikne konečná koncentrace:

| -Cu | Co | Cd |
|---|-------|-------|
| -125 mg/ml | 30 | 70 |
| - další koncentrace: 50 μ l kovu + 50 μ l SDW | | |
| - 62,5 | 15 | 35 |
| -31,25 | 7,5 | 17,5 |
| -15,625 | 3,758 | 8,75 |
| -7,8125 | 1,875 | 4,375 |
- na destičku pipetuji všechny koncentrace i PK a NK ve třech opakováních!
- pipetuji: 330 μ l bujónu
10 μ l kovu

až nakonec 10 μ l buněk
- PK 340 μ l bujónu + 10 μ l buněk
- NK 350 μ l bujónu
- Bioscreen: 600nm, 30°C, měřící interval 30 min., třepat 40 h