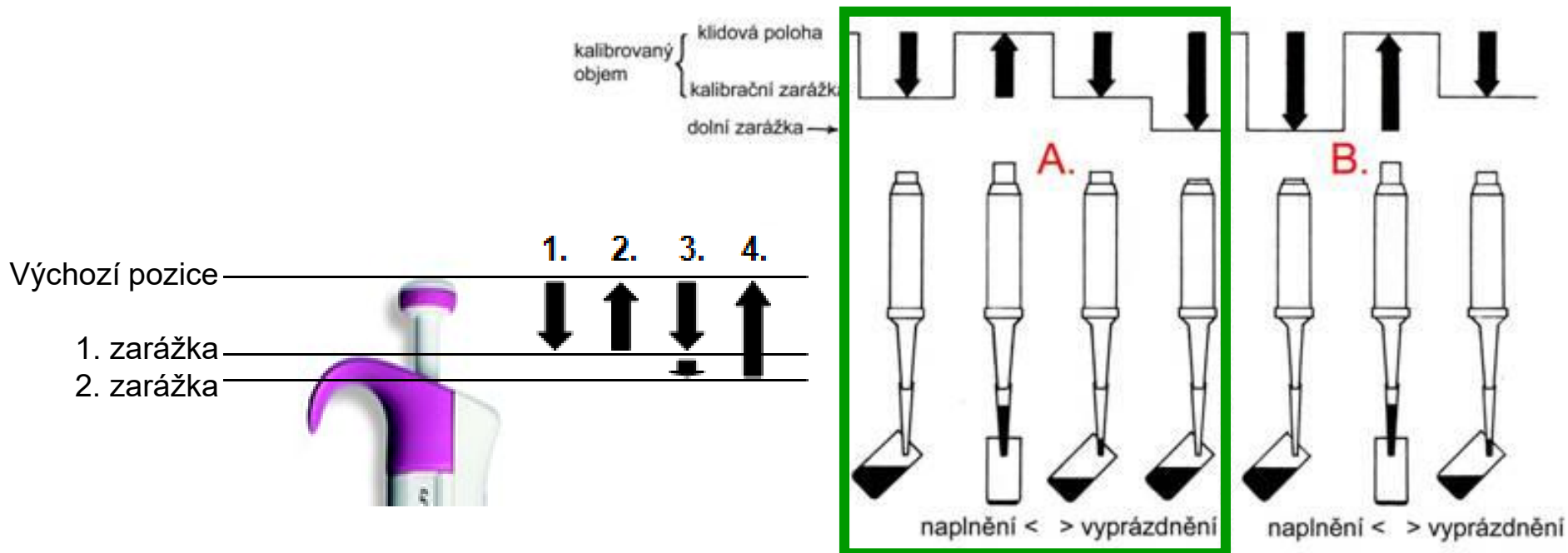


# Bi3030c Fyziologie živočichů - cvičení

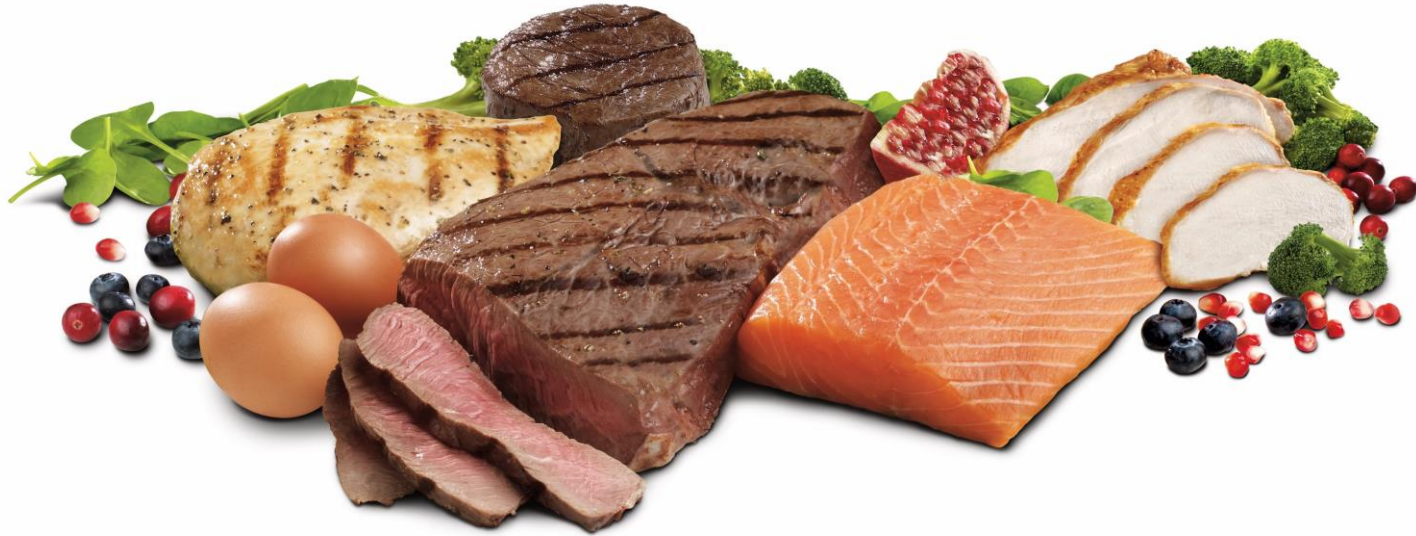
- **docházka** na cvičení (maximálně dvě absence – omluvená a neomluvená, jinak si domluvit nahrazení cvičení)
- **karanténa nebo příznaky nemoci > napište vyučujícímu!**
- **protokoly** (odevzdávat průběžně do Odevzdáárny):
  - jméno, příjmení, datum, téma cvičení
  - stručný teoretický úvod související s podstatou úlohy (např. co jsou bílkoviny, biuret apod.)
  - stručný postup (kolik čeho, kam, jak dlouho... aby se dal podle popisu experiment zopakovat)
  - v krocích rozepsané vyhodnocení/výpočet
  - závěr (zhodnocení výsledků v porovnání s teorií úlohy)
  - protokoly vypracovávejte samostatně!
- **zápočtový test** (na konci semestru) + zkoušení během semestru
- demonstrace experimentů v ISu
- **dodržujte bezpečnost práce!**
- plášť a přezůvky dle vlastního uvážení, rukavice budou v případě potřeby k dispozici v praktiku

# Pipetování

- přesné odměřování objemů tekutin
- vždy dbejte na správný rozsah (přesnější je pipetovat v horní polovině udávaného rozsahu pipety; **nikdy nepipetujte mimo rozsah!**)
- správné špičky
- výměna špiček
- přesnost a správná praxe pipetování

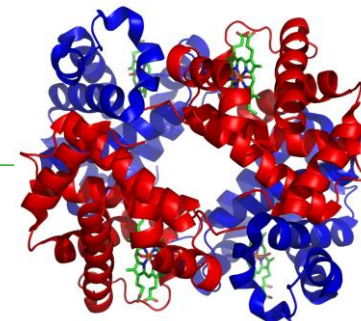


# Stanovení celkové koncentrace bílkovin v tělních tekutinách

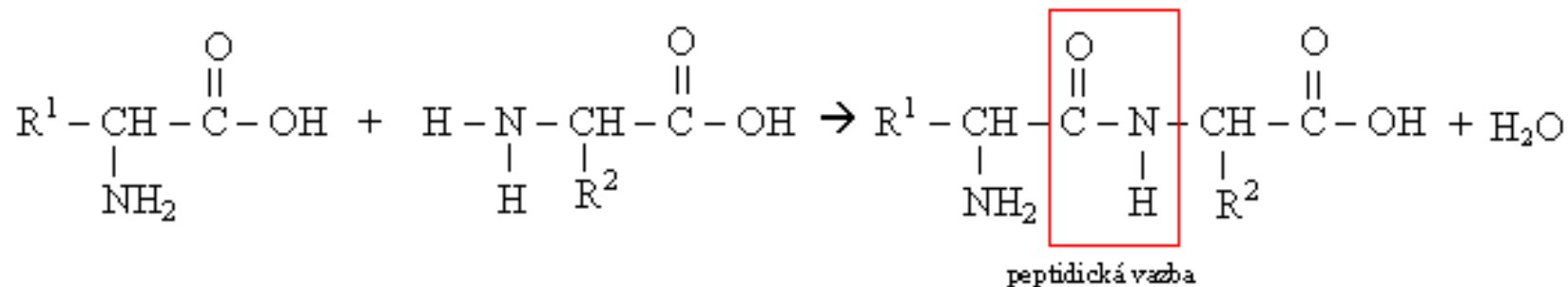


- proteiny
- biuretová reakce a její využití v praxi
- tělní tekutiny
- modelové organismy
- praktická část: stanovení koncentrace proteinů

# Proteiny



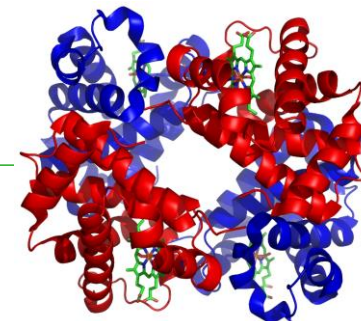
- AMK spojené peptidovou vazbou
- vznik na ribozomech
- oligopeptidy (2–10 AMK), polypeptidy (11–50/100 AMK), vlastní bílkoviny (více než 50/100 AMK)



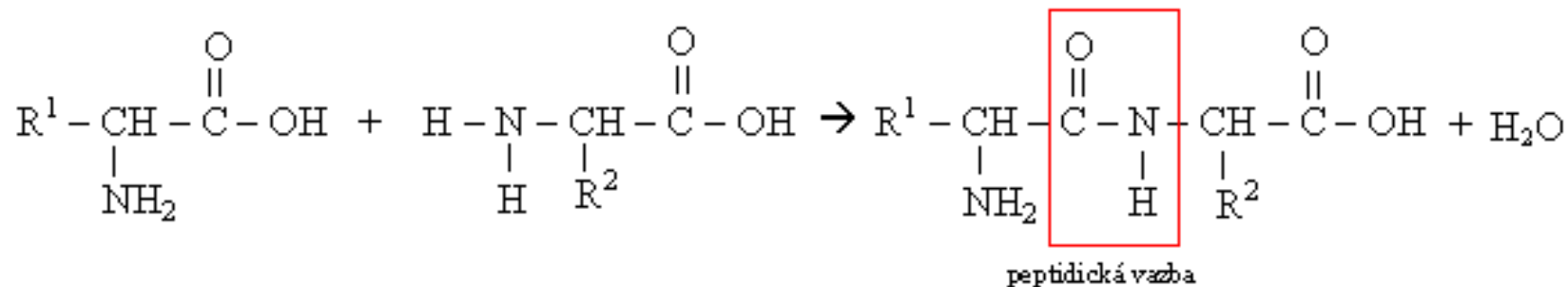
## Obecná funkce bílkovin:

- stavební
- transportní a skladovací
- zajišťující pohyb
- katalytické, řídicí a regulační
- ochranné a obranné

# Proteiny



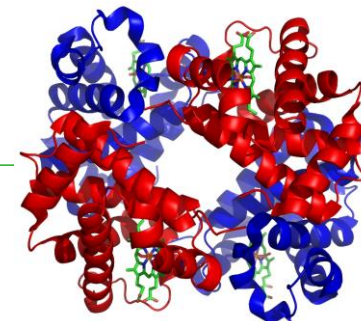
- AMK spojené peptidovou vazbou
- vznik na ribozomech
- oligopeptidy (2–10 AMK), polypeptidy (11–50/100 AMK), vlastní bílkoviny (více než 50/100 AMK)



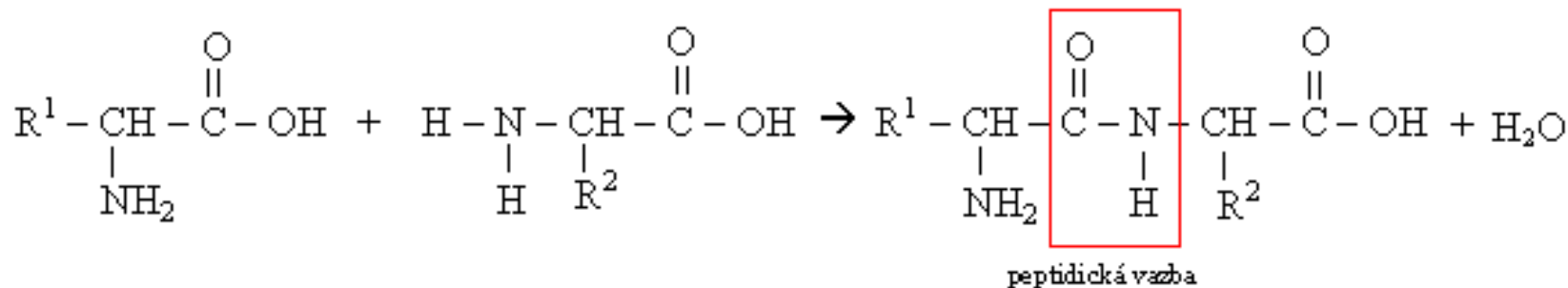
## Obecná funkce bílkovin:

- stavební (kolagen, elastin, keratin...)
- transportní a skladovací (hemoglobin, transferin...)
- zajišťující pohyb (aktin, myosin...)
- katalytické, řídicí a regulační (enzymy, hormony, receptory...)
- ochranné a obranné (imunoglobulin, fibrin, fibrinogen...)

# Proteiny



- AMK spojené peptidovou vazbou
- vznik na ribozomech
- oligopeptidy (2–10 AMK), polypeptidy (11–50/100 AMK), vlastní bílkoviny (více než 50/100 AMK)



## Funkce plazmatických bílkovin:

- imunitní (globuliny)
- hemostatická (fibrinogen)
- transportní (albuminy - nepolární tuky, cholesterol, steroidní hormony)
- onkotický tlak udržující funkce (albuminy)
- pH udržující (pufrovací) funkce
- řídící a katalytická (hormony, enzymy)

# Tělní tekutiny

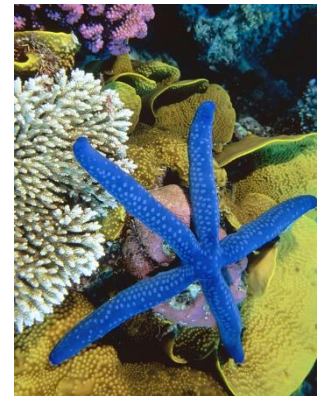
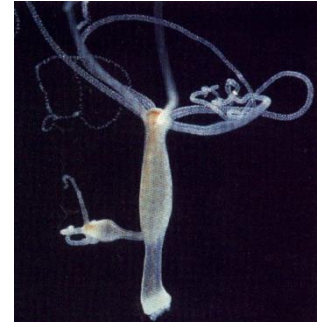
- funkce transportní, zásobní, opěrná atd.

## Hydrolymfa (láčkovci, ostnokožci)

- roztok solí, málo bílkovin a volných buněk

## Hemolymfa (hmyz, korýši, měkkýši)

- celková bílkovina okolo 6 %
- barviva, volné buňky, bílkoviny:
  - zásobní proteiny (především larvální stádia)
  - transportní proteiny (lipoforiny, transferin...)
  - hormony (adipokinetický, prothoracikotropní, bursikon...)
  - vitellogeniny (samičí proteiny, které tvoří hlavní součást žloutkového vaku)
  - imunitní proteiny (lysozym, koagulační proteiny...)





# Tělní tekutiny

---

**Krev** (obratlovci) = plazma + krevní elementy

- transport cholesterolu, glukózy, tuků, iontů (Fe, Cl a další)
- bílkoviny krve (celková bílkovina 6-8 %):
  - albuminy (60 % plazmatických bílkovin) – vážou vodu, transport Cu, Zn, mastných kyselin, hormonů
  - globuliny (40 % plazmatických bílkovin) – vážou tuk, hormony, imunitní reakce (Ig)
  - fibrinogen, aj. (<1 %)

**Tkáňový mok** (extracelulární tekutina; bez plazmatických bílkovin)

**Lymfa** (z tkáňového moku; imunitní a transportní funkce)

Plodová voda, mozkomíšní mok, perilymfa a endolymfa v uchu, oční komorová voda a další.



# Celková bílkovina v plazmě obratlovců

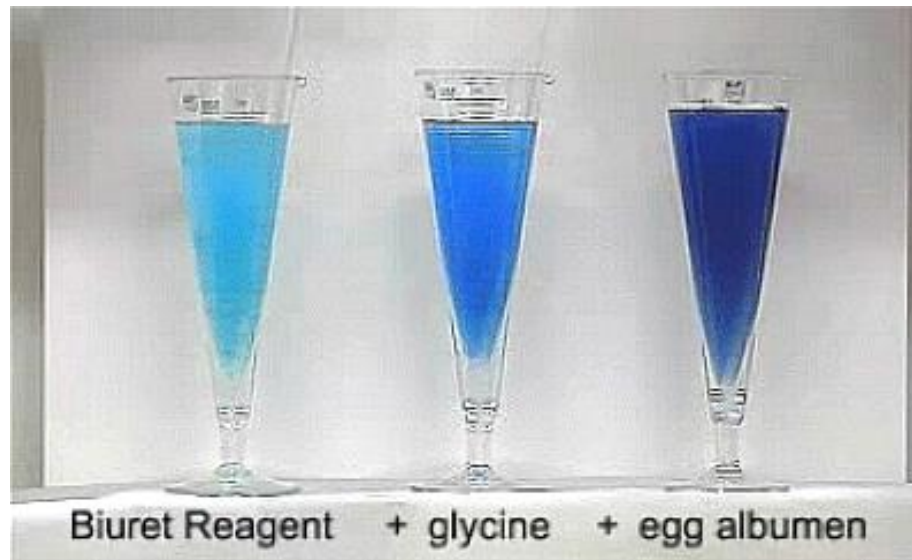
---

	Celková bílkovina [g/l]		Celková bílkovina [g/l]
žako	35-45	kajmanka	47
amazoňan	29-51	užovka	43
ara	26-43	zmije	55
andulka	14-36	krokodýl	65
jestřáb	24-31	varan	69
holub	15-35		
kachna	35-45	skot	65-80
		prase	65-85
jeseter	45	kůň	46-70
kapr	41,5	kočka	60-80
pstruh	34,6	pes	60-80

Pozn.: Hodnoty orientační (plazi, ryby vybrány z konkrétních studií, relativně malé *n*).

# Stanovení proteinů – biuretová reakce

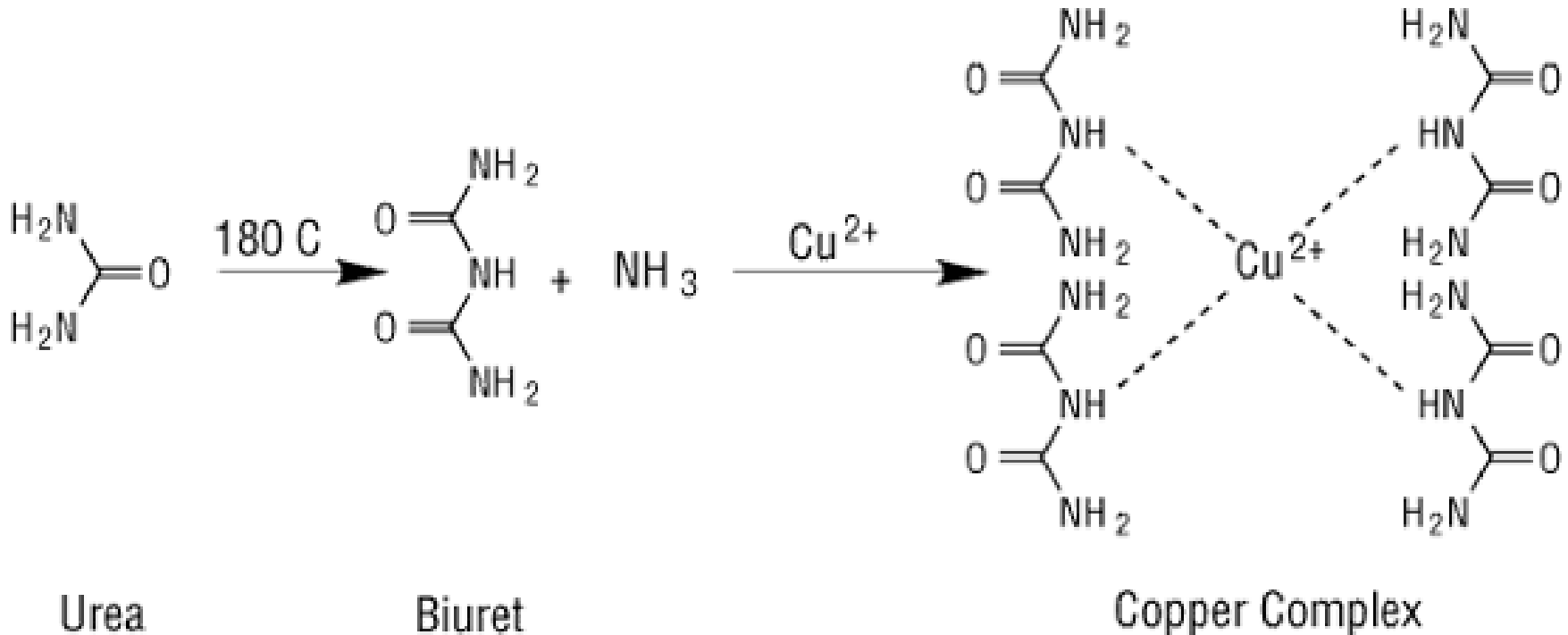
- důkaz bílkovin ve vzorku (reakce s peptidy tvořenými nejméně 3 AMK)
- **biuretové činidlo**
  - 6mM  $\text{CuSO}_4$
  - 5M NaOH
  - 21mM  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  (chelaton 3)



- peptidové vazby tvoří v alkalickém prostředí se solemi mědi charakteristicky červenofialově barevný komplex - **biuret**
- biuret = kondenzační produkt dvou molekul močoviny

# Stanovení proteinů – princip biuretové reakce

- v zásaditém prostředí proteinové řetězce vytvoří „matrix“ kolem  $\text{Cu}^{2+}$  > fialová barva
- **intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb**



# Stanovení proteinů – laboratorní praxe

---

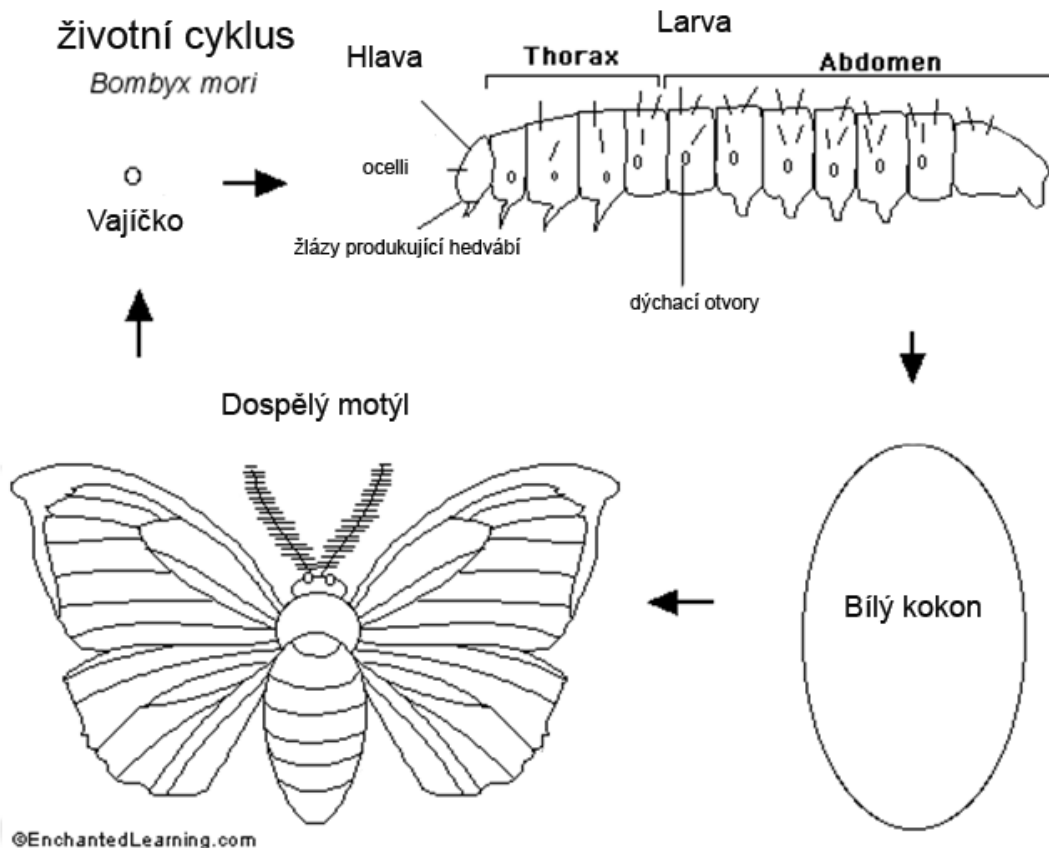
- komerční kity, např. Bio-Rad Protein Assay:
  - modifikace na mikrotitrační destičku
  - 5 ul vzorku/standardu + 25 ul reagenčního roztoku A + 200 ul reagenčního roztoku B
  - po 15 min inkubace měřeno při 700 nm
  - nutná kalibrační křivka



# Modelové organismy

## bourec morušový (*Bombyx mori*)

- Lepidoptera, Bombycidae
- produkce hedvábí





# Modelové organismy

## bourec morušový - zpracování hedvábí

- před vylíhnutím motýla je nutné kokony s kuklami usušit
- vaření kokonů
- vlákno (fibroiny)
- hedvábné proteiny (sericiny)



# Modelové organismy



## bourec morušový - zajímavosti

- monofágie (moruše)
- pohlavní dimorfismus (samička větší, terčíky)



- hybridi - monovoltinní druhy („jednosnůškové“) s bílým kokonem
  - polyvoltinní druhy mající např. žlutý kokon (xantofyly)
- dospělec nelétá a nepřijímá potravu
- vyšlechtěn v Číně (3000 př. n. l.); dnes JV Asie, Japonsko, Brazílie
- vlákno až 1,5 km dlouhé
- 2 t listí > 120 kg kokonů > 20 kg hedvábí

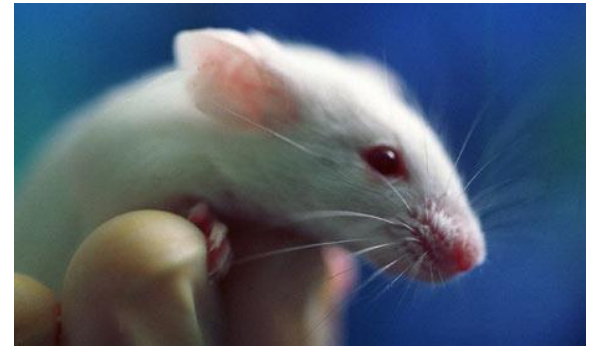


# Modelové organismy

---

## myš domácí (*Mus musculus*)

- tradiční modelový organismus
- krev (krevní plazma / sérum + krevní buňky)
- majoritní proteiny      3-5 % albuminy  
   1-3 % globuliny  
   0,5 % fibrinogen



pes domácí (*Canis lupus f. familiaris*)

kočka domácí (*Felis silvestris f. catus*)

tur domácí (*Bos taurus*)

kapr obecný (*Cyprinus carpio*)

lín obecný (*Tinca tinca*)

karas obecný (*Carassius carassius*)



# Praktická úloha

- 1 ml biuretového činidla + 20  $\mu$ l blanku/standardu/vzorku > promíchat  
blank (voda) k eliminaci absorbance samotného biuretového činidla  
standard (komerční lidské sérum 70 g/l) k vypočítání celkové bílkoviny ostatních vzorků  
vzorky - hemolymfa bource (samička, sameček), zavíječe, sérum obratlovců (myš, kapr, karas, lín, příp. jiné)
- 10-12 min inkubace > vizuální zhodnocení
- **spektrofotometrické měření absorbance při 544 nm**
- **Lambert–Beerův zákon:** koncentrace látky ve vzorku odpovídá jeho absorbanci (přímá úměra)

Celková koncentrace bílkovin v měřeném vzorku  $\longrightarrow$

$$c \text{ (g/l)} = c_s \times \frac{A}{A_s}$$

Koncentrace bílkovin standardu (70 g/l)

Absorbance vzorku

Absorbance standardu

# Praktická úloha

---

	1	2	3	4	5	6	7
Biuretové činidlo	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Standard	20 $\mu$ l						
Blank (H <sub>2</sub> O)		20 $\mu$ l					
Hemolymfa samce bource			20 $\mu$ l				
Hemolymfa samice bource				20 $\mu$ l			
Fetální bovinní sérum (FBS)					20 $\mu$ l		
Rybí sérum						20 $\mu$ l	
Psí sérum							20 $\mu$ l
...stejně i další vzorky							