

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

Jméno:	
Obor:	Datum provedení:

**TEORETICKÝ ÚVOD*****Počítání buněk***

Jednou z nezbytných dovedností při práci s biologickým materiálem je stanovení počtu buněk ve vzorku. V současné době se v praxi k počítání buněk využívají především speciální přístroje zajišťující rychlé a automatizované počítání buněk ve vzorku, ale v rámci výzkumu se můžeme ještě stále setkat i s využitím počítacích komůrek ve spojení se světelným mikroskopem. Počítací komůrky jsou tvořeny silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou, kdy nejčastěji využívanou počítací komůrkou je Bürkerova komůrka. Počítací síť této komůrky je tvořena 9 velkými čtverci (každý o ploše 1 mm<sup>2</sup>), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je 0,04 mm<sup>2</sup>) (Obrázek 1).

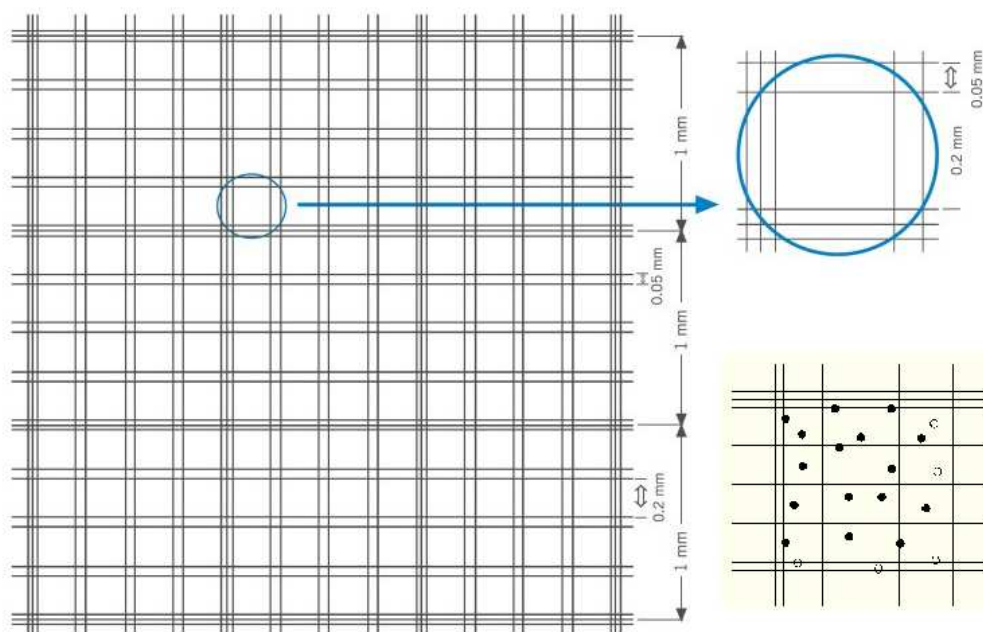
Aby se v rámci počítání buněk pomocí počítacích komůrek zabránilo dvojímu počítání buněk, započítávají se pouze ty buňky, které se nacházejí uvnitř čtverce a buňky, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran (např. horní a levá) (Obrázek 1). Pro stanovení množství buněk v 1 ml suspenze se používá výpočet:

$$X = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}$$

- X... koncentrace buněk v 1 ml suspenze
- a... stanovený počet buněk
- n... počet opakování (počet spočítaných čtverců – alespoň deset)
- V... objem počítaného útvaru

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### Úloha č.5 Počítání buněk a test životaschopnosti



**Obrázek 1.** Počítací síť Bürkerovy komůrky a pravidlo pro počítání částic v počítací komůrce. Do celkového počtu částic se započítávají pouze ty, které leží nebo se dotýkají dvou zvolených stran, v tomto případě horní a levá (označeny černě).

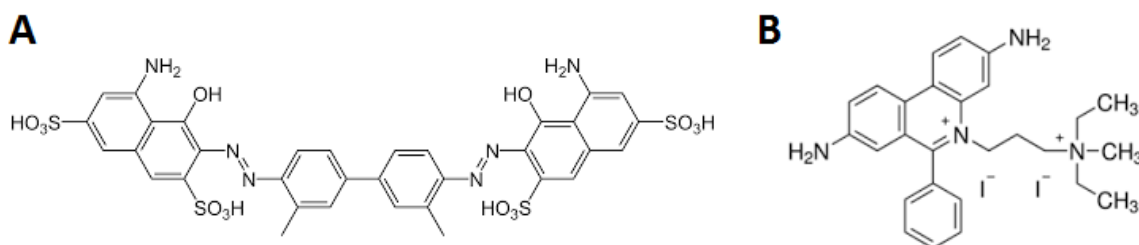
### **Stanovení životaschopnosti buněk**

Jedním se základních parametrů při práci s buňkami je stanovení jejich životaschopnosti (viability) vyjádřené poměrem živých a mrtvých buněk v populaci. Test životaschopnosti má v praxi značný význam při kontrole životaschopnosti mikroorganismů během kultivace, kdy sledujeme jejich odpověď (změnu počtu) na přidavek či úbytek různých látek či na fyzikální proces. Jedna skupina metod pro analýzu viability je založena na neporušenosti a selektivní propustnosti plazmatické membrány živé buňky a využívá barviv s nízkou molekulovou hmotností nesoucích kladný nebo záporný náboj. Živé buňky se průniku barviva „brání“ svými kanálky v membráně; nepropustí jej tedy nebo jej odbourají. K barvení se využívá netoxických barviv. Tyto sloučeniny mohou procházet pouze přes porušenou membránu

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

### Úloha č.5 Počítání buněk a test životaschopnosti

mrtvých buněk, zatímco živé buňky je nepropustí a zůstávají nezbarvené. Příkladem barviva využívaného pro kolorimetrické stanovení buněčné viability může být například trypanová modř (Obrázek 2A) a zástupcem barviva využívaného pro fluorescenční stanovení životaschopnosti propidium jodid (Obrázek 2B).



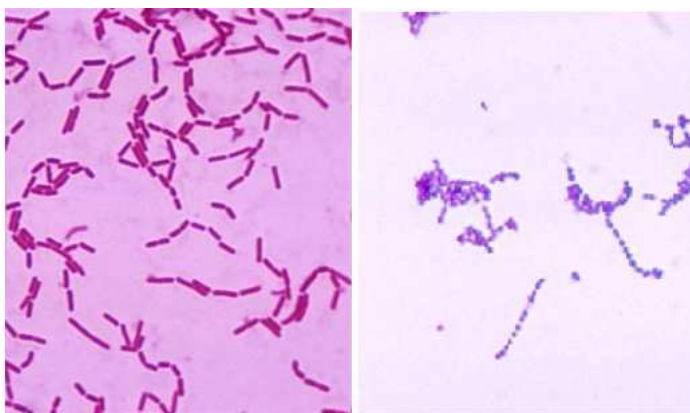
**Obrázek 2.** Chemická struktura trypanové modři (A) a propidium jodidu (B).

### *Pichia pastoris*

V rámci cvičení použijeme kvasinku *Pichia pastoris* patřící mezi eukaryontní kvasinkové organismy hojně využívané při heterologní expresi proteinů v bioreaktorech a sloužící společně se *Saccharomyces cerevisiae* jako modelový eukaryontní organismus. Botanicky je řadíme mezi houby – vzhledem k jejich velikosti mezi mikromycety spolu s plísněmi. Kvasinky jsou většinou jednobuněčné organismy rozmnožující se pučením nebo dělením tvořící na pevných médiích kolonie a askospory. Většina kvasinek má nízkou teplotní odolnost.

## Barvení bakterií ve vzorku jogurtu dle grama

Mléčné kvašení je proces anaerobního kvašení probíhající za přítomnosti bakterií mléčného kvašení. V rámci procesu mléčného kvašení bakterie vyrábějí z jednoduchých sacharidů (hlavně mono-, di- a oligosacharidů) kyselinu mléčnou. Díky bakteriím mléčného kvašení neupravené mléko během 24 hodin (při teplotě 15 - 35°C) samovolně kysne. V potravinářském průmyslu jsou např. bakterie mléčného kvašení využívány k přípravě řady mléčných výrobků (jogurty, podmásli, zákysy, acidofilní mléko, kefír, apod.). Zástupci bakterií mléčného kvašení v mléčných výrobcích jsou např. streptokoky



Obrázek 1. Ukázka bakterií *Streptococcus lactis* (vlevo) a *Lactobacillus acidophilus*

(*Streptococcus lactis*; *S. thermophilus*), diplokoky (*Diplococcus cremoris*) a tyčinkovité laktobacily (*Lactobacillus bulgaricus*; *L. jogurti*; *L. acidophilus*).

Metoda barvení dle Grama je založená na rozdílném složení buněčné stěny gram-positivních a gram-negativních bakterií, jejímž výsledkem je rozdílná reakce některých látek v buněčné stěně bakterií. Jedna skupina bakterií obsahuje kyselinu teichovou, která po obarvení krystalovou violetí a Lugolovým roztokem vytvoří pevný barevný komplex, který se nevymývá etanolem nebo směsí etanolu a acetonu. V preparátu mají tyto bakterie barvu krystalové violeti - fialovou až modrofialovou a jsou nazývány jako gram-positivní (G+). Druhá skupina bakterií neobsahuje kyselinu teichovou v buněčné stěně, takže nedochází k tvorbě komplexu a krystalová violet se etanolem nebo směsí etanolu a acetonu vymývá. Po následném dobarvení preparátu barvivem karbolfuchsinem nebo O-safraninem se tyto bakterie obarví na růžovo a jsou nazývány jako gram-negativní (G-).

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

### PRAKTICKÁ ČÁST

#### A. Stanovení koncentrace buněk v suspenzi

##### Postup práce:

1. Dobře zhomogenizujte buněčnou suspenzi pomocí vortexu.
2. Napipetujte 15  $\mu$ l buněčné suspenze na hranu krycího skla Bürkerovy komůrky tak, aby suspenze rovnoměrně pokrývala celou počítací plochu komůrky.
3. Bürkerovu komůrku vložte do zorného pole mikroskopu a při zvětšení objektivu (4x) najděte počítací síť. Při větším zvětšení objektivu (40x) potom spočítejte buňky v 10 počítacích čtvcích.
5. Vypočítejte průměrný počet buněk v 10 čtvcích.
6. Stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.
7. Poté buněčnou suspenzi 10 x zředte přidáním PBS pufru a stejným způsobem napipetujte 15  $\mu$ l buněčné suspenze i do prostoru druhé počítací sítě.
8. Spočítejte buňky v 10 čtvcích, stanovte koncentraci buněk v 1 ml suspenze.

##### Výsledky:

Počet buněk <i>P. pastoris</i>											
Čtverec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Průměr
1 x ředěné											
10 x ředěné											

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

Zhodnoťte výsledky obou počítání buněk *P. pastoris*.

### **B. Hodnocení viability buněk trypanovou modří**

#### Postup práce:

1. Na vortexu zhomogenizujte suspenzi kvasinek a připravte si dvě 1.5 ml zkumavky
2. Do každé napipetujte 200  $\mu$ l kvasinkové suspenze.
3. Zkumavku dejte na 10 minut do termobloku předehřáté na 90 °C.
4. Po uplynutí doby inkubace smícháme 100  $\mu$ l vzorku kvasinek (po inkubaci při 90°C) se 100  $\mu$ l 0.4% roztoku trypanové modři.
5. Kápneme 50  $\mu$ l obarvené suspenze na sklíčko s mřížkou.
6. Přikryjeme krycím sklíčkem a hodnotíme pod mikroskopem.
7. Zhodnotíme poměr živých buněk (neobarvené, silně světlolomné) a mrtvých buněk (modré) z celkového počtu 10 počítacích čtverců na vzorek.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

### Výsledky:

Stanovení viability suspenze <i>P. pastoris</i>											
Čtverec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Průměr
Živé buňky											
Mrtvé buňky											
Viabilita (%)											

Stanovení viability suspenze <i>P. pastoris</i> po inkubaci při 90°C											
Čtverec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Průměr
Živé buňky											
Mrtvé buňky											
Viabilita (%)											

Zhodnoťte vliv teploty na viabilitu kvasinky *P. pastoris*.

## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

### C. Příprava preparátu bakterií z jogurtu

#### Postup práce:

1. Do kapky destilované vody na podložním sklíčku přidejte sterilním bakteriologickým očkem jogurt o velikosti špendlíkové hlavičky.
2. Pomocí bakteriologické očka preparát rozetřete po sklíčku a následně fixujte plamenem tak, že sklíčko protáhneme plamenem.
3. Následně na preparát nakapejte barvivo methylenovou modř a barvěte po dobu 5 minut.
4. Poté barvivo opláchněte destilovanou vodou a podložní sklíčko s preparátem nechte oschnout.
5. Mikroskopujeme bez vody a krycího sklíčka při zvětšení objektivem 60x.

### D. Barvení bakterií podle Grama

#### Postup práce:

1. Připravte si preparát dle bodů 1 a 2 z předchozí úlohy.
2. Na takto připravený preparát kápněte kapku krystalové violeti a nechte působit 20 sekund.
3. Následně opláchněte krystalovou violet pomocí Lugolova roztoku a nechte působit 20 sekund.
4. Poté preparát odbarvujeme aceton-ethanolovou směsí tak, že odbarvovací směs lijeme opatrně na zešikmené sklíčko nad nátěr a následně dobře opláchněte destilovanou vodou.
5. Preparát dobarvěte zředěným O-safraninem po dobu 1 minuty a nakonec ho opláchněte vodou a nechte oschnout.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Úloha č.5  
Počítání buněk a test životaschopnosti

Okomentujte a zakreslete pozorované tvary bakterií a uveďte, jaký typ bakterií dle Gramova barvení se v jogurtu vyskytoval.