

Kolo: Celoštátne

Kategória: B

Teoreticko-praktická časť

Praktická úloha č. 1

Téma: Bunkové obaly a transport látok u kvasiniek

Huby a rastliny patria medzi organizmy, ktorých bunky sú pred účinkami hypotonického prostredia chránené prítomnosťou bunkovej steny, ktorá je v oboch prípadoch tvorená prevažne polysacharidmi. Pre štúdium procesov prebiehajúcich v bunkách týchto organizmov je často potrebné pripraviť osmoticky senzitívne bunky zbavené bunkových stien – protoplasty. Vašou úlohou bude ošetriť kvasinky pripravenými látkami a pozorovať odpoveď takto ošetrených buniek na rôzne typy podmienok prostredia.

Pomôcky: Erlenmeyerova banka s kvasinkovou kultúrou (jedna pre 6 študentov), automatické pipety (1000 μ l, 20 μ l) a dva druhy špičiek, 1 prázdna 2 ml skúmavka, 3 prázdne 1,5 ml skúmavky, kadička na odpad, skúmavka s roztokom TME, skúmavka s roztokom SCE, vodný kúpeľ (spoločný pre všetkých) nastavený na 35 °C, skúmavka so zymolýzou umiestnená na ľade, termoblok nastavený na 37 °C (spoločný pre všetkých), podložné a krycie sklíčka, mikroskop, papierové utierky, kadička s destilovanou vodou, 4 sklené skúmavky, spektrofotometrická kyveta, skúmavka so sterilným YPD médiom, fixka

Zloženie roztokov:

SCE: 1,2 M sorbitol (osmoticky aktívna látka), 60 mM EDTA, 0,1 M citrát sodný; pH = 7

TME: 0,1 M Tris/HCl (pH = 7,3), 1 % β -merkaptotanol (redukčné činidlo schopné rozrušiť disulfidové mostíky), 0,1 M EDTA

zymolýza: enzým izolovaný z baktérie *Arthrobacter luteus*, má β -1,3-glukán laminaripentaohydrolázovú a β -1,3-glukanázovú aktivitu

Úloha 1:

Postup:

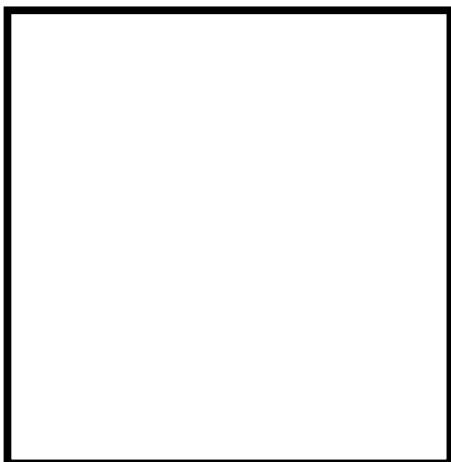
1. Na začiatku úlohy skontrolujte, či máte všetky potrebné pomôcky. Ak nie, privolajte vedúcu úlohy. Pri práci si skúmavku, s ktorou pracujete vždy označte fixkou svojim súťažným

číslo na vrch skúmavky. Na bok skúmavky môžete fixkou pridať označenie vzorky, aby sa vám vaše skúmavky medzi sebou nemýlili.

2. Z Erlenmayerovej banky s kvasinkovou kultúrou odoberte 2 ml kultúry do 2 ml skúmavky.
3. Odobratú kultúru centrifugujte 5 min. na 1500 g.
4. Supernatant pomocou pipety preneste do odpadovej kadičky. Pri odstraňovaní supernatantu **vždy** pipetujte opatrne, aby ste nepoškodili pelet!
5. Pelet dôkladne rozsuspendujte (opatrným pipetovaním hore-dolu) v 500 μ l roztoku TME a inkubujte vo vodnom kúpeli 10 minút na 35 °C.
6. Centrifugujte kvasinkovú suspenziu 5 min. na 1500 g.
7. Odstráňte supernatant ako v kroku 3.
8. Pelet dôkladne rozsuspendujte v 500 μ l roztoku SCE, pridajte 5 μ l roztoku zymolyázy a inkubujte 20 minút pri 37 °C v termobloku. Počas inkubácie v termobloku zmerajte optickú hustotu (OD) vašej kultúry (pozri nižšie, úloha č. 3).
9. Po inkubácii preneste zymolyázou ošetrovanú vzorku do 1,5 ml skúmavky.
10. Z Erlenmayerovej banky s kvasinkovou kultúrou odoberte 1500 μ l do 1,5 ml skúmavky (kontrolná vzorka). Centrifugujte spolu so vzorkou z kroku 7 po inkubácii so zymolyázou, podmienky centrifugácie: 5 min. na 1500 g.
11. Z oboch vzoriek odstráňte supernatant a každú resuspendujte v 60 μ l roztoku SCE.
12. Pripravte mikroskopický preparát kontrolnej vzorky aj vzorky ošetrenej TME a zymolyázou z 10 μ l suspenzie. Pozorujte pripravené preparáty pri takom zväčšení, pri ktorom budú jasne viditeľné jednotlivé bunky. Svoje pozorovanie zakreslite nižšie:

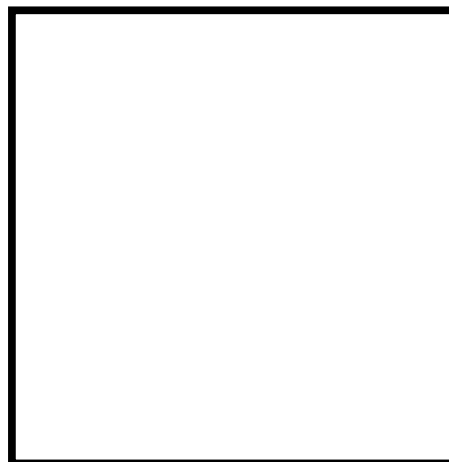
Kontrolná vzorka

Použité zväčšenie:



Vzorka ošetrovaná TME+zymolyázou

Použité zväčšenie:

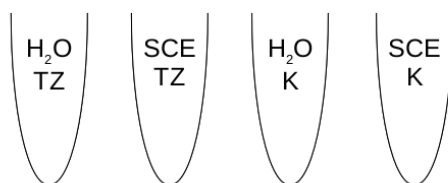


Uved'te slovné, aké rozdiely ste pozorovali medzi preparátmi a vysvetlite, čo tieto rozdiely spôsobili:

Po zodpovedaní tejto otázky musíte najneskôr do 10 minút privolať vedúcu úlohy, ktorá skontroluje pripravené suspenzie.

V ktorej vzorke ste pozorovali protoplasty?

13. Skontrolujte efektivitu reakcií nasledujúcim testom. Pripravte si 4 sklené skúmavky, označte dve ako „H₂O“ a dve „SCE“. Do označených sklenených skúmaviek napipetujte 2 ml vody alebo roztoku SCE, podľa označenia na skúmavke. Do prvej dvojice skúmaviek s vodou a SCE napipetujte do každej 20 µl kvasinkovej suspenzie oštrenej TME a zymolyázou (označte „TZ“), do druhej dvojice skúmaviek po 20 µl kontrolnej vzorky (označte „K“). Schéma nižšie demonštruje, aké skúmavky by ste mali mať pripravené.



Nechajte inkubovať približne 30 sekúnd, počas inkubácie skúmavky niekoľkokrát jemne pretrepte. Uved'te, aké rozdiely ste pozorovali medzi preparátmi a vysvetlite, čo tieto rozdiely spôsobili:

Úloha 2: Doplňte pojmy na vyznačené miesta v texte.

Štruktúra bunkovej steny kvasiniek je tvorená vrstvami niekoľkých rôznych polymérov. _____ vrstva je tvorená manoproteínmi, v ktorých sa na seba viažu proteíny a manóza, pričom ich interakcia je sprostredkovaná disulfidovými mostíkmi. Táto vrstva môže byť narušená s použitím _____. _____ vrstva je tvorená najmä $\beta(1\rightarrow3)$ glukánmi, s $\beta(1\rightarrow6)$ glukánovými rozvetveniami a napojením na jednotky _____. Táto vrstva môže byť narušená s použitím _____.

Pojmy na doplnenie: vonkajšia, vnútorná, chitín, celulóza, glykogén, enzýmy, baktérie, redukčné činidlá, oxidačné činidlá

Vysvetlite, na základe čoho ste doplnili pojmy „vonkajšia“ a „vnútorná“.

Úloha 3: Pri ošetrovaní buniek zymolýzou je veľmi dôležité, v akom štádiu rastu kultúry sa kvasinkové bunky nachádzajú. Štruktúra bunkovej steny sa totiž mení v závislosti od toho, či je kultúra kvasiniek v exponenciálnej fáze, teda vo fáze aktívneho rastu, alebo v stacionárnej fáze, kde je hustota buniek vysoká, zdroje sa mŕňajú, hromadia sa odpadové látky a kvasinky rastú pomaly, až kultúra dosiahne tzv. fázu *plateau*, kde už viac nehustne. Na meranie, v ktorej fáze bunkového cyklu sa kvasinky nachádzajú, sa často používa metóda nazývaná spektrofotometria. Podstatou tejto metódy je meranie množstva svetla istej vlnovej dĺžky, ktoré prechádza vzorkou – čím viac svetla je vzorkou pohltené, tým vyššia je hustota kultúry.

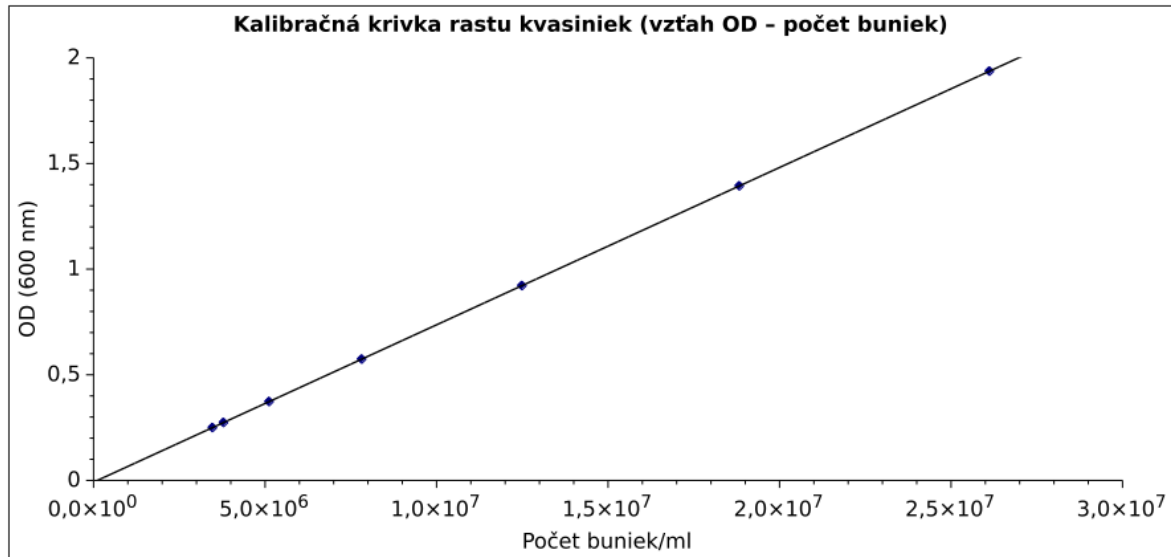
Vašou úlohou bude odmerať optickú hustotu (*optical density*, OD) vašej vzorky a na základe kalibračnej krivky, ktorú máte k dispozícii na obrázku nižšie, odhadnúť počet buniek na mililiter vo vašej kultúre.

1. Z Erlenmayerovej banky s kvasinkovou kultúrou, z ktorej ste odoberali kvasinky na začiatku experimentu v úlohe 1, odoberte 1 ml do 1,5 ml skúmavky.
2. Do spektrofotometrickej kyvety napipetujte 1 ml kontrolného roztoku – čistého YPD média (tzv. „blank“).
3. Zmerajte optickú denzitu roztoku *blank*.
4. Pipetovaním odstráňte z kyvety *blank* a napipetujte do kyvety kvasinkovú kultúru.
5. Zmerajte optickú denzitu kvasinkovej kultúry a zapíšte svoj výsledok:

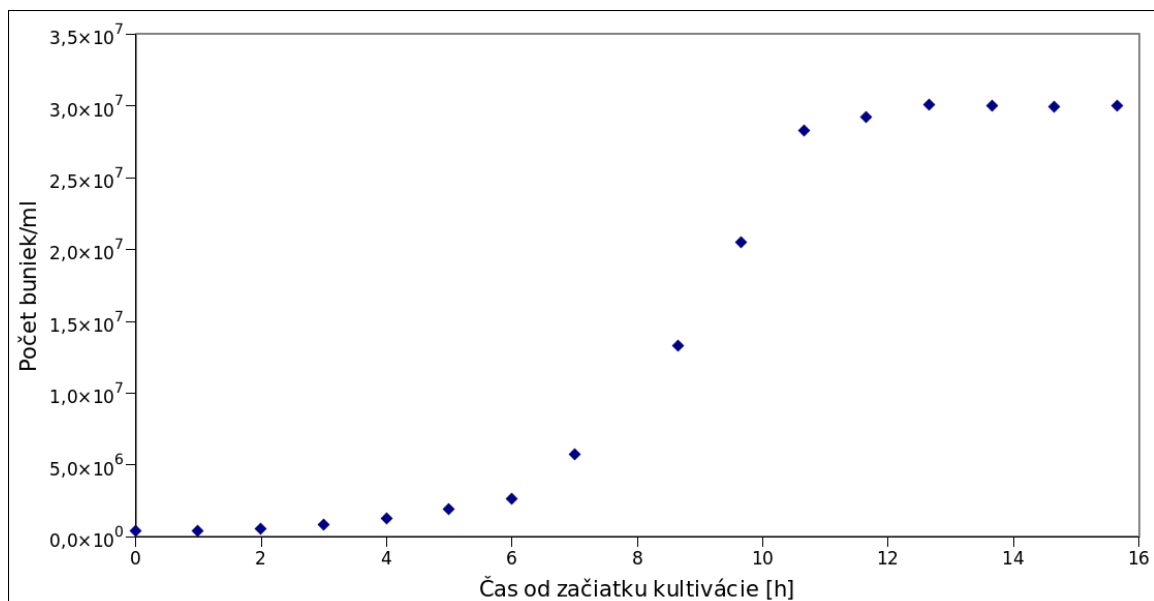
OD_{600 nm} = _____

6. Použite nižšie uvedený graf, aby ste z kalibračnej krivky odčítali počet buniek vo vašej vzorke. V obrázku schematicky znázorníte, ako ste postupovali pri výpočte. Výsledok:

_____ buniek/ml



Na obrázku nižšie vidíte graf, ktorý znázorňuje priebeh rastu kvasinkovej kultúry, od úvodnej lag fázy pomalého rastu až po stacionárnu fázu. V ktorej fáze sa vaša meraná kvasinková kultúra nachádza? V obrázku schematicky znázorníte, ako ste postupovali pri odhade.



- A) lag fáza
- B) exponenciálna fáza
- C) stacionárna fáza (*plateau*)

Vysvetlite svoju odpoveď:

Úloha 4: Kvasinkové bunky a jednobunkové riasy sa okrem hypotonického prostredia musia dokázať vysporiadať aj s prípadným pôsobením hypertonickeho prostredia.

- A) Vysvetlite, či sa bunková stena kvasiniek môže podieľať aj na ochrane buniek pred účinkami prostredia s vysokým obsahom osmoticky aktívnych látok.

- B) Niektoré morské a halotolerantné mikroorganizmy dokážu prežiť a rozmnožovať sa aj v mimoriadne hypertonickeho prostredí. Ktoré z nasledujúcich mechanizmov môžu slúžiť ako adaptácia na život v takomto prostredí?

- a) vysoká koncentrácia osmoticky aktívnych organických látok rozpustených v cytoplazme
- b) veľmi nízka koncentrácia osmoticky aktívnych organických látok rozpustených v cytoplazme
- c) zvýšená miera aktívneho transportu osmoticky aktívnych anorganických solí z buniek
- d) zvýšené množstvo akvaporínov – membránových kanálov, ktoré umožňujú osmotický presun vody