

PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Saccharomyces cerevisiae a jejich pozorování pomocí optického mikroskopu

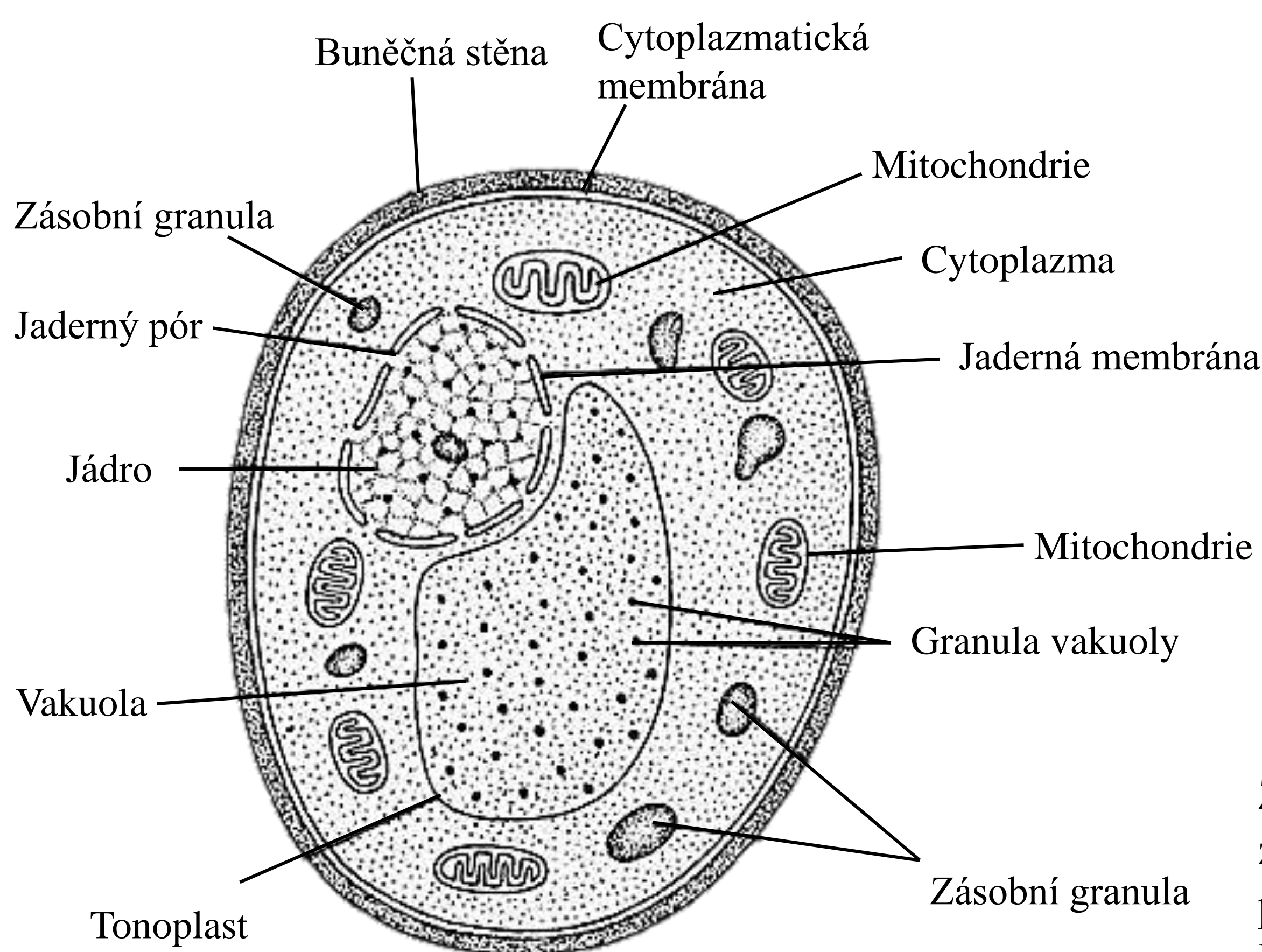
Taxonomické zařazení: *Ascomycetes*

Buňky *S. cerevisiae* jsou elipsoidní i kulovité, velké 5-10 mikrometrů. Rozmnožují se 1) vegetativně – multilaterálním holoblastickým pučením; 2) pohlavně – haplo-diplobiotický životní cyklus, vegetativní buňky se mění přímo na asky. Spóry diploidních kmenů jsou po 1 – 4 v asku, jsou kulovité s hladkou stěnou. Kmeny jsou homothalické i heterothalické.

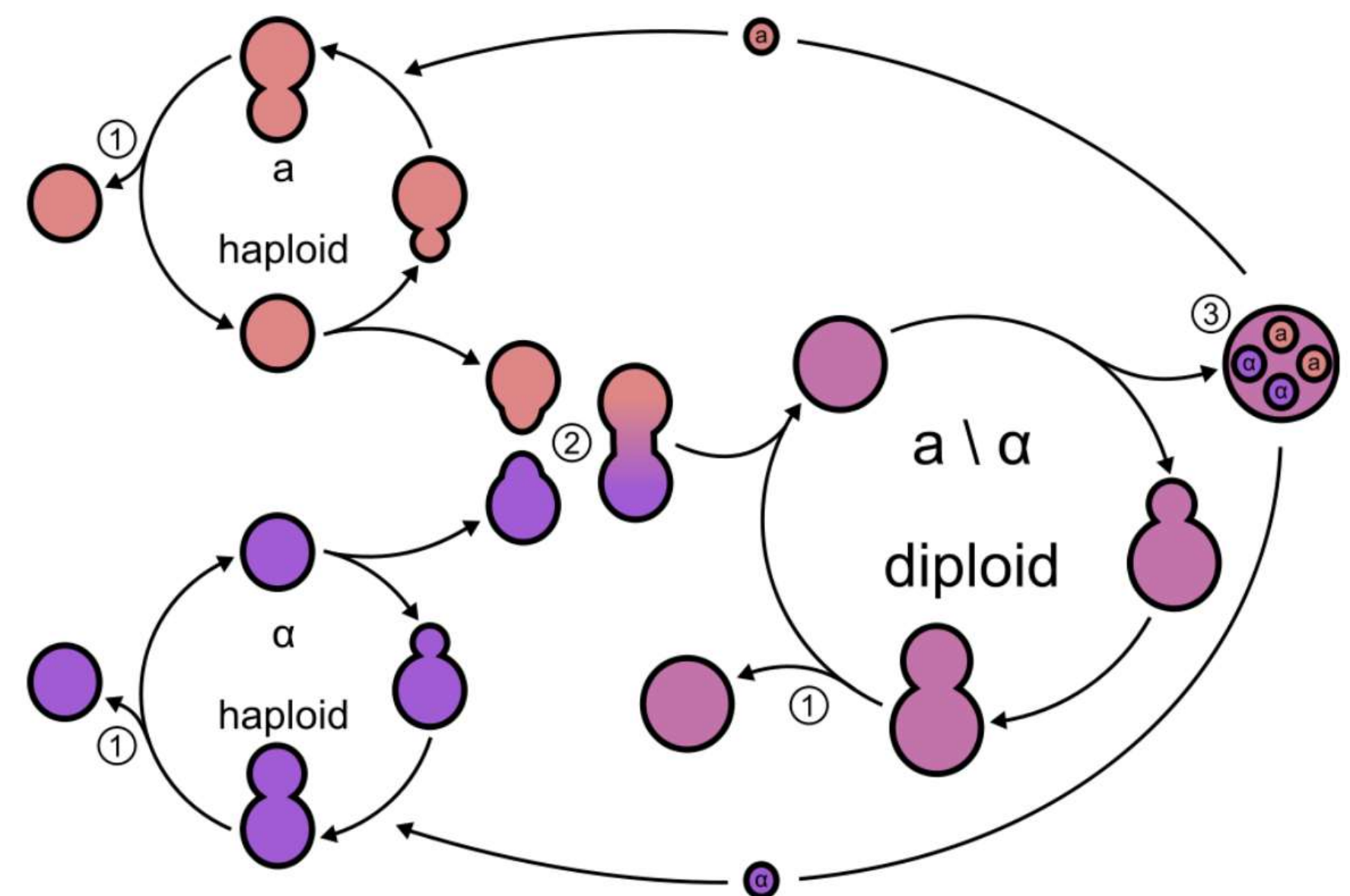
S. cerevisiae se v molekulární biologii využívá jako modelový organismus pro studium eukaryotní buňky, díky snadné a levné kultivaci, podobné metabolické pochody jako vyšší eukaryota a také dokáže žít jako haploid.

Postup mikroskopického pozorování

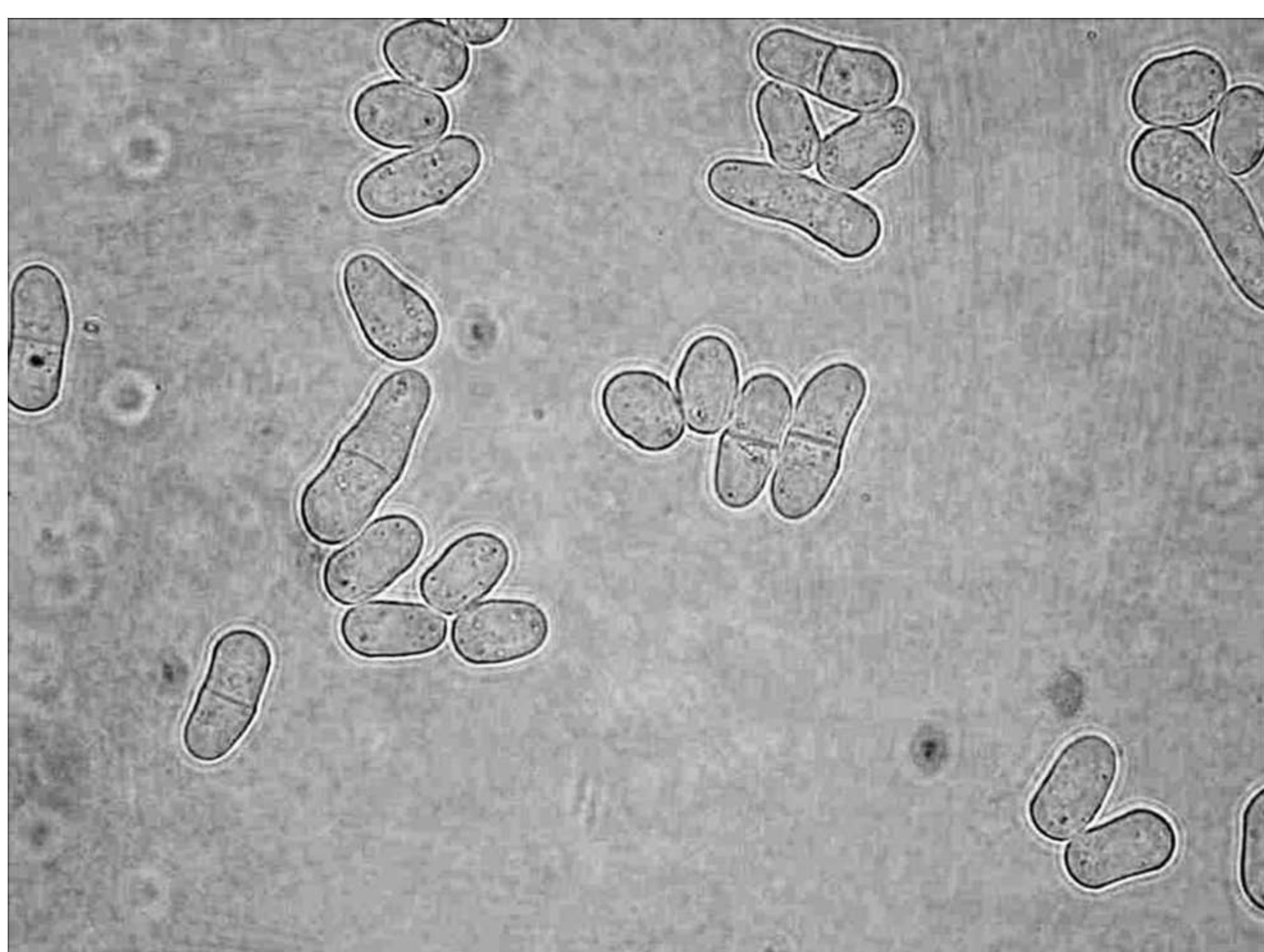
- Připravíme si suspenzi kvasinkových buněk z pekařského droždí ve sterilní destilované vodě v Erlenmeyerově baňce
- Z ní pipetujeme po 20 μ l suspenze na podložní sklíčko a následně opatrně zakryjeme krycím sklíčkem
- Pozorujeme pod světelným mikroskopem při vhodném zvětšení 100x10 (používáme imerzní olej)
- Případně lze využít barvení pro vizualizaci mrtvých a živých buněk
 - Barvení preparátu *S. cerevisiae* (vitální barvení) - přikápneme k hraně krycího skla kapku 0,5 % roztoku methylenové modři a prosajeme filtračním papírem. Výsledné zjištění: Mrtvé buňky budou tmavě modře zbarvené, živé buňky budou nezbarvené.



Stavba buňky *S. cerevisiae*



Životní cyklus buňky *S. cerevisiae*. Existují dvě základní životní formy buněk, haploidní a diploidní. Haploidní buňky prochází prostým životním cyklem (mitóza, růst, apoptóza). Diploidní buňky (typická pro kvasinky) procházejí podobným životním cyklem, ale v zhoršených životních podmínkách začnou sporulovat – vytvářet haploidní spory. Dvě spory posléze splynou (konjugují) v novou buňku.



S. cerevisiae v optickém mikroskopu při zvětšení 400x



S. cerevisiae optickém mikroskopu při zvětšení 1000x



Pučící *S. cerevisiae* optickém mikroskopu při zvětšení 1000x

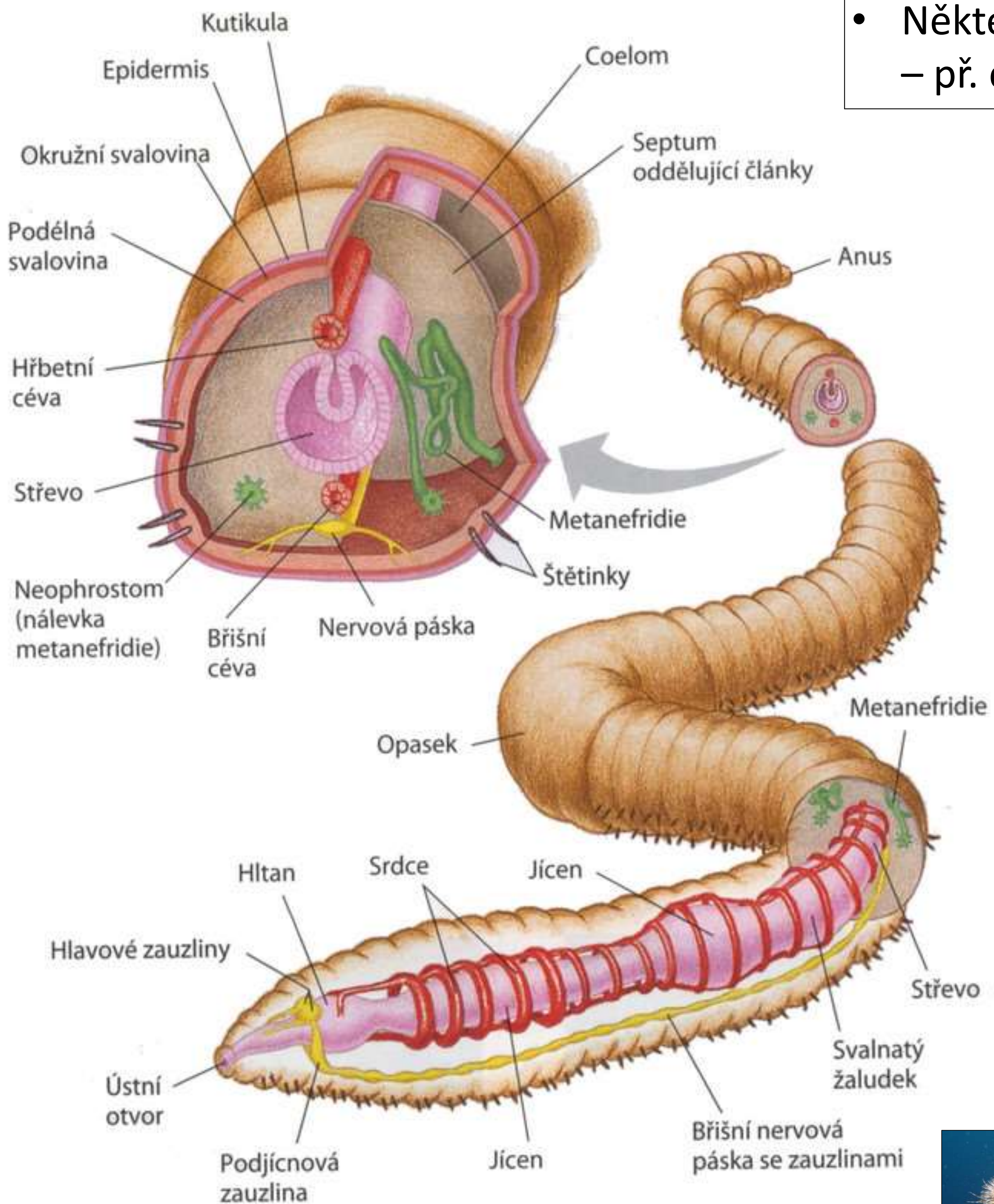
PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Kroužkovci (Annelida)

Clitellata

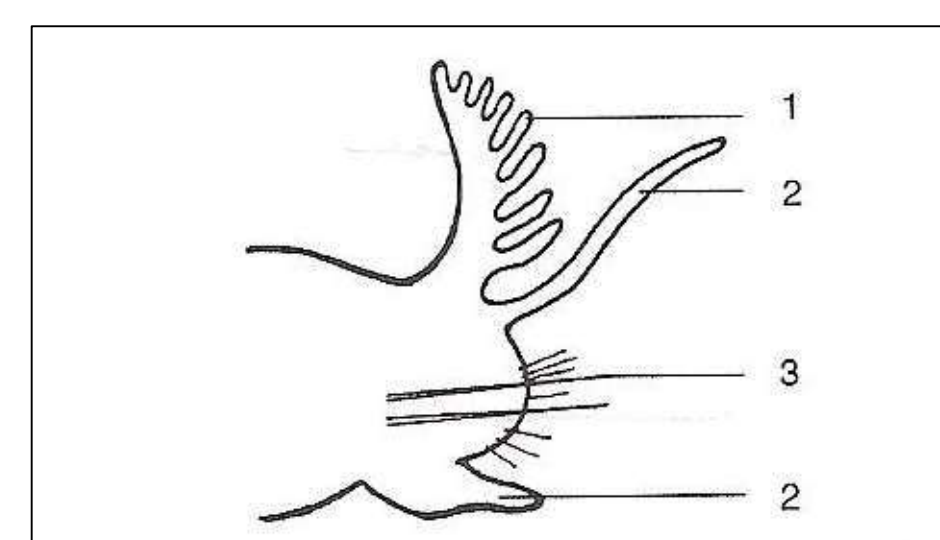
- **Nevytváří parapodia**
- **Opasek**
- Máloštětinatci
 - **tyflosolis** (prokrvená epiteální řasa)
 - Cévní soustava uzavřená
 - Vylučovací ústrojí - **metanefridie**
 - Nervová soustava gangliová
 - Přímý vývoj
 - Regenerace

- **PRVOÚSTÍ COELOMOVÍ ČLÁNKOVANÍ**
- Stejnocenná segmentace
- Třídy: **mnohoštětinatci, opaskovci**
- Z kroužkovců se vyvinuly **drápkovci, želvušky a jazyčnatky**
- **Cefalizace** – smyslové orgány v přední části těla (dravé vodné formy)
- **Pygidium** – srostlé poslední články
- Některé orgány se opakují v každém článku – př. nervové uzliny
- Některé orgány prostupují celým tělem – př. cévní soustava



Polychaeta

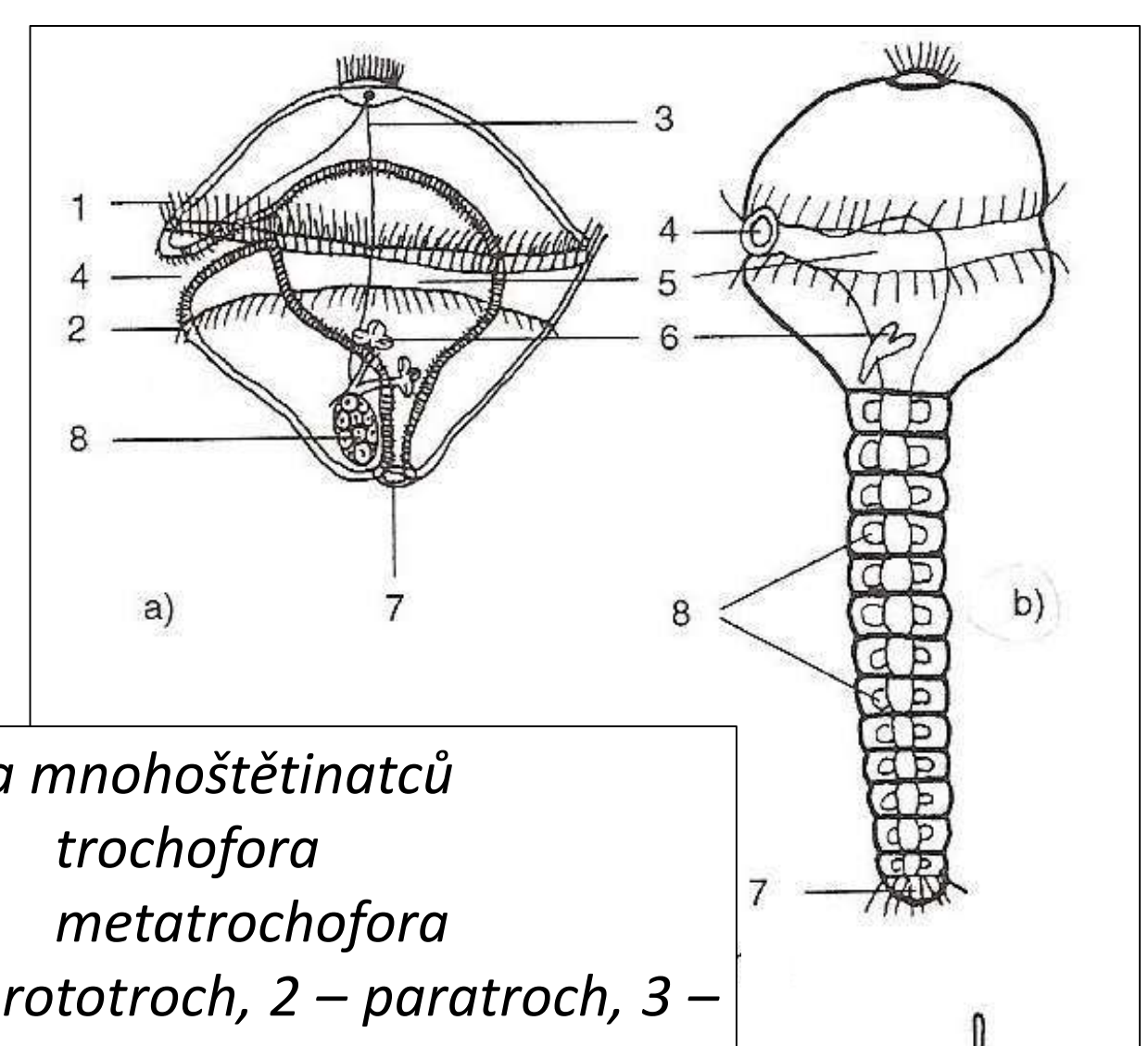
- **Parapodia**
- Cévní soustava uzavřená
- Nervová soustava gangliová
- Nepřímý vývoj -> **trochofora, metatrochofora**



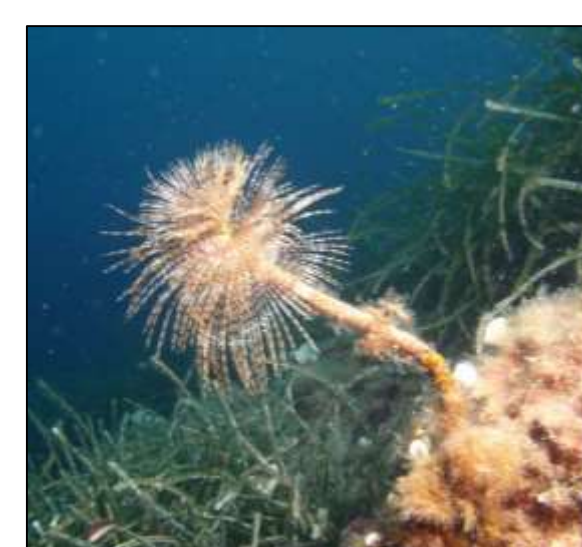
Parapodium – 1 – žábry, 2 – hmatový výběžek, 3 – štětinky



Eunice viridis



Larva mnohoštětinatců
a) trochofora
b) metatrochofora
1 – prototroch, 2 – paratroch, 3 – nervové vlákno, 4 – ústní otvor, 5 – žaludek, 6 – metanefridie, 7 – řitní otvor, 8 – coelomové včky



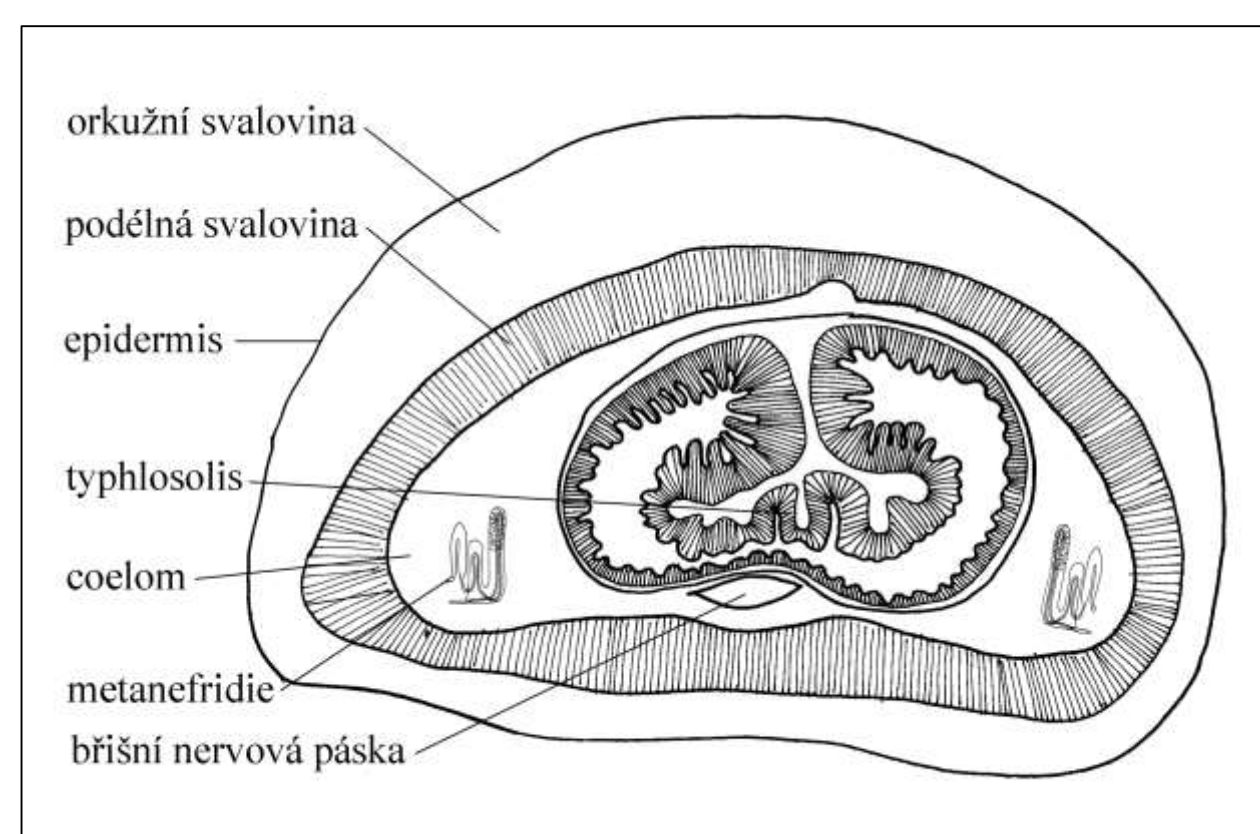
Sabella spallanzanii



Aphrodita aculeata

Hirudinea

- **Přísavky**
- **Ektoparazité**
- **Chitinové čelisti**



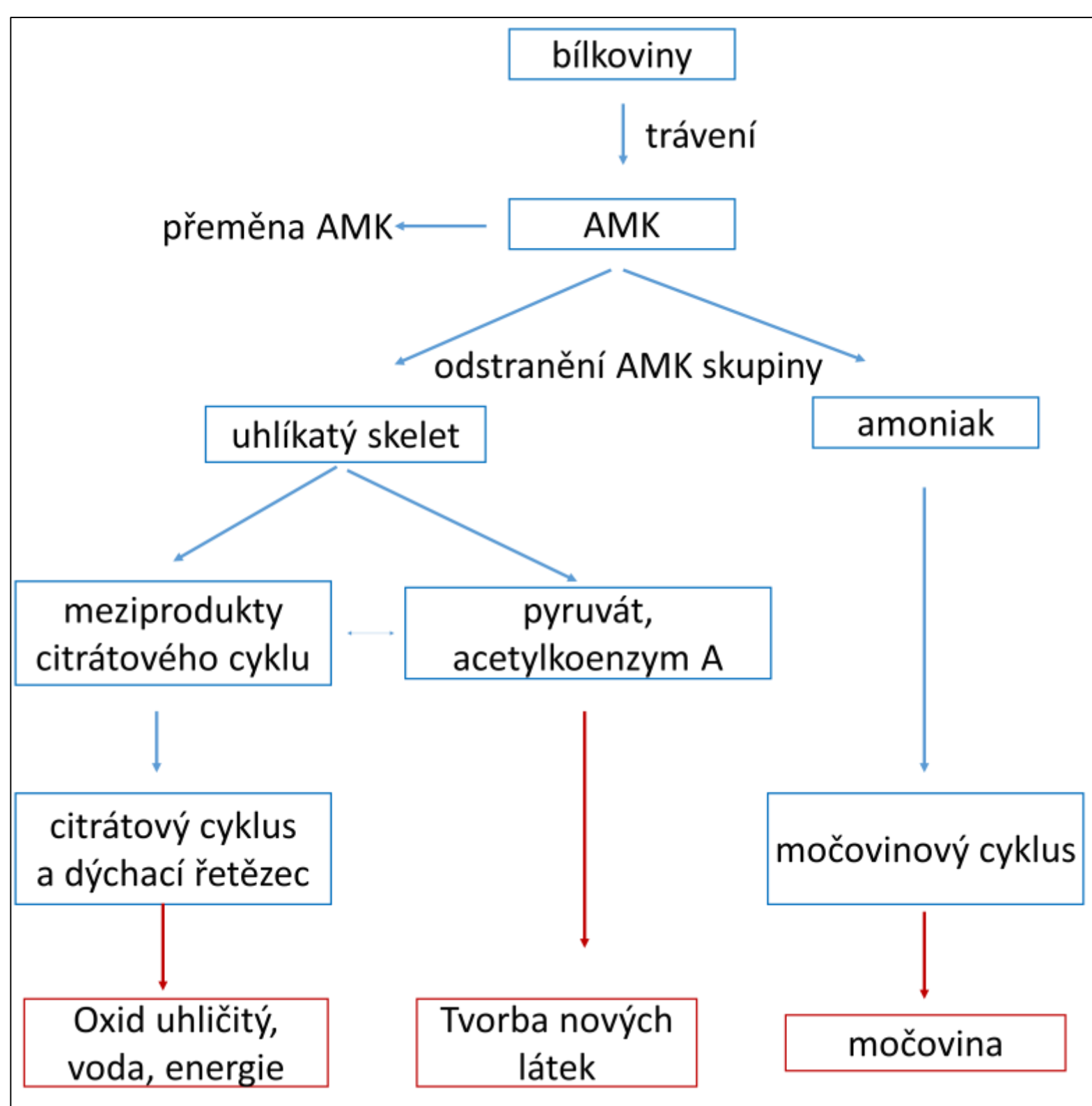
PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Bílkoviny

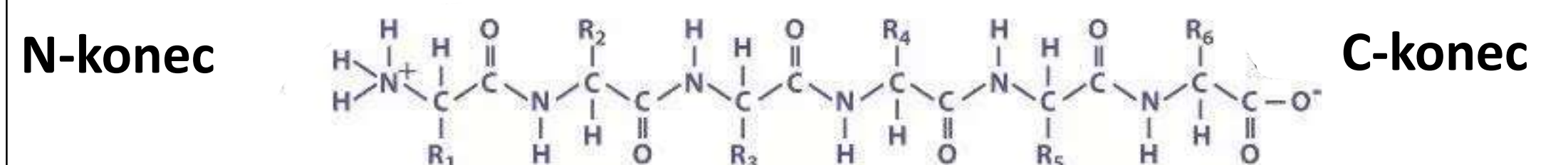
- základní stavební jednotky živé hmoty
- vznik (poly)kondenzací aminokyselin
- makromolekulární látky biologického původu – biopolymery
- funkce: stavební, zásobní, transportní, imunitní, syntéza DNA, membránové proteiny, katalyzátor

Stavba

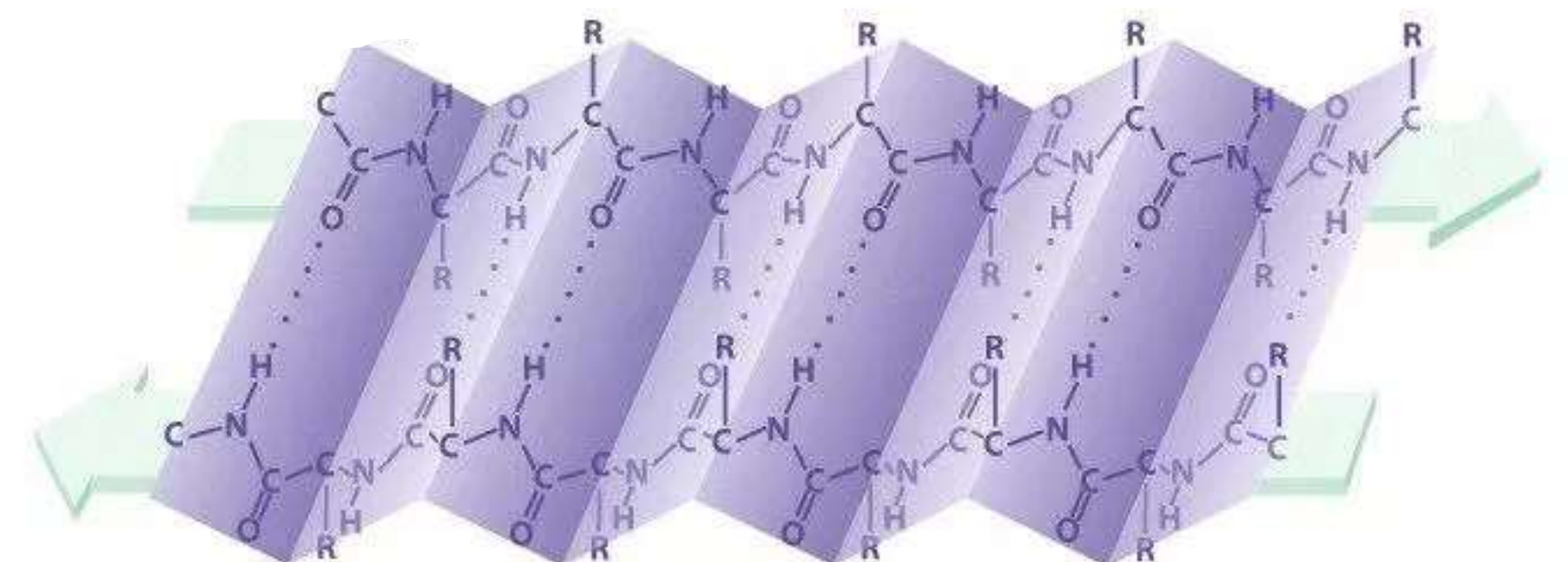
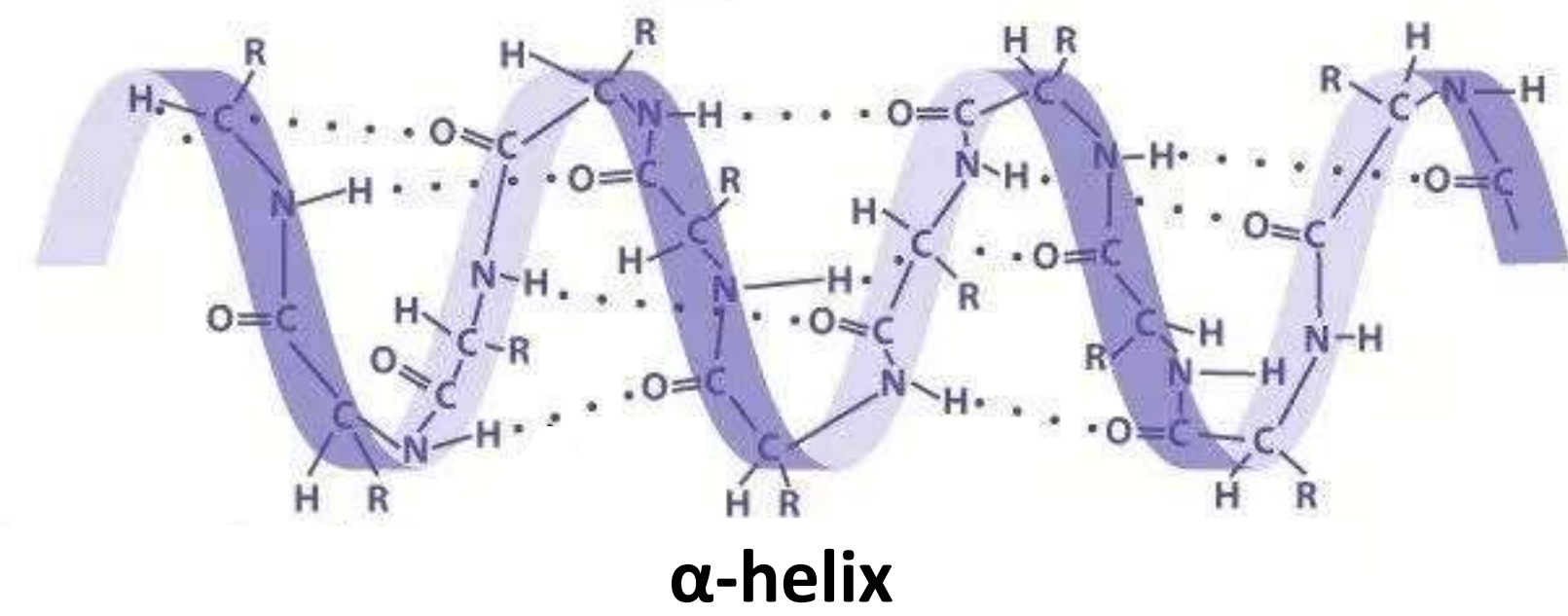
- primární:** pořadí a typ AK, lineární
- sekundární:** α -helix (pravotočivá šroubovice), β -skládání list
- terciární:** prostorové uspořádání sekundární struktury, vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly
- kvartérní:** jinak uspořádaná terciární struktura, může být i více řetězců (hemoglobin), i nebílkovinné složky



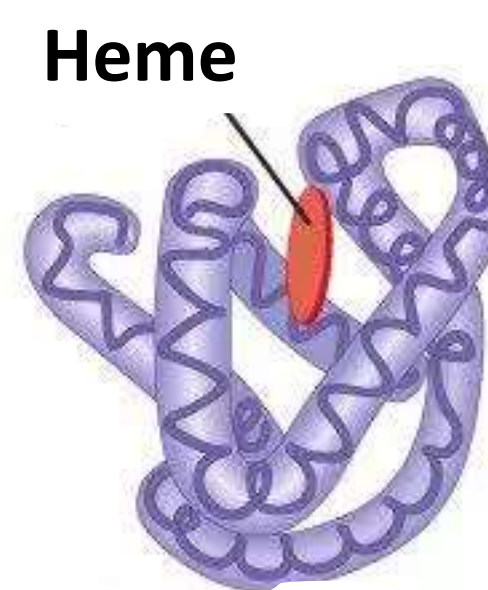
Primární struktura



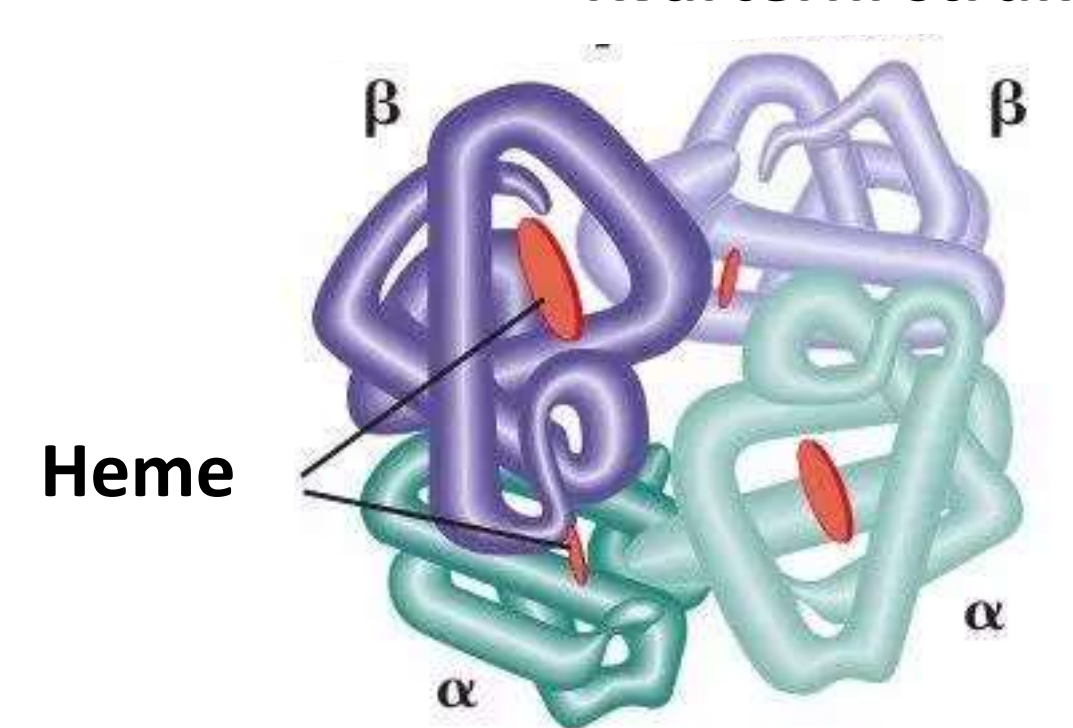
Sekundární struktura



Terciární struktura



β -skládání list



Kvartérní struktura

Biuretová reakce

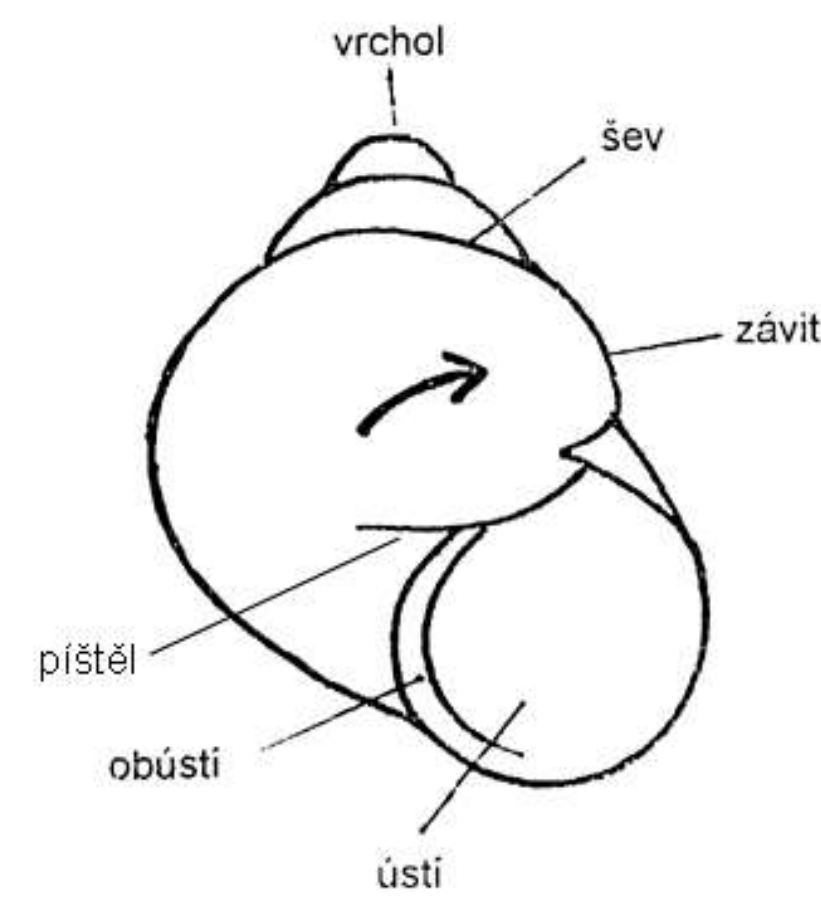
- Důkaz peptidové vazby
- Aminokyseliny vytvoří v alkalickém prostředí se solemi Cu **komplex-biuret**
- Roztok bílkoviny se smíchá s 10% NaOH a 10% roztokem modré skalice, vzniká modrý komplex



PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Měkkýši (Mollusca)

- Nečlánkované tělo bez končetin
- Útrobní vak
- PLŽI, MLŽI, HLAVNOŽCI



Gastropoda

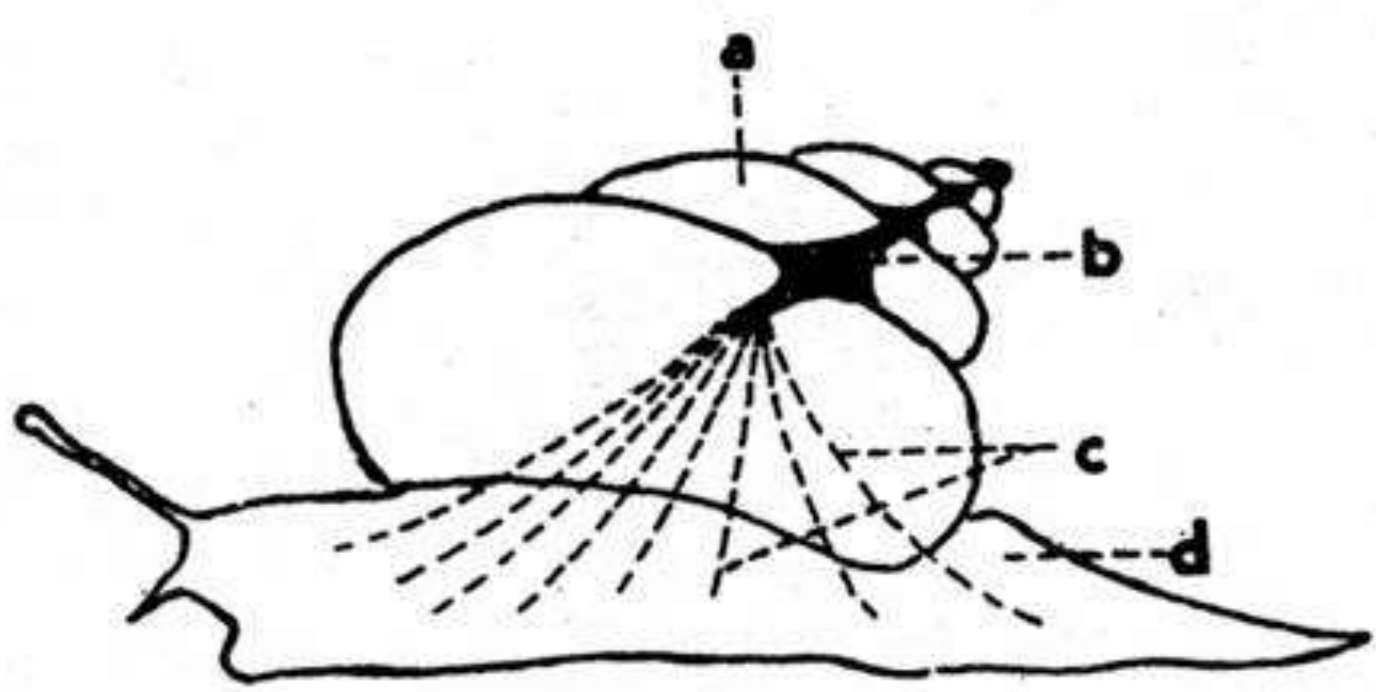
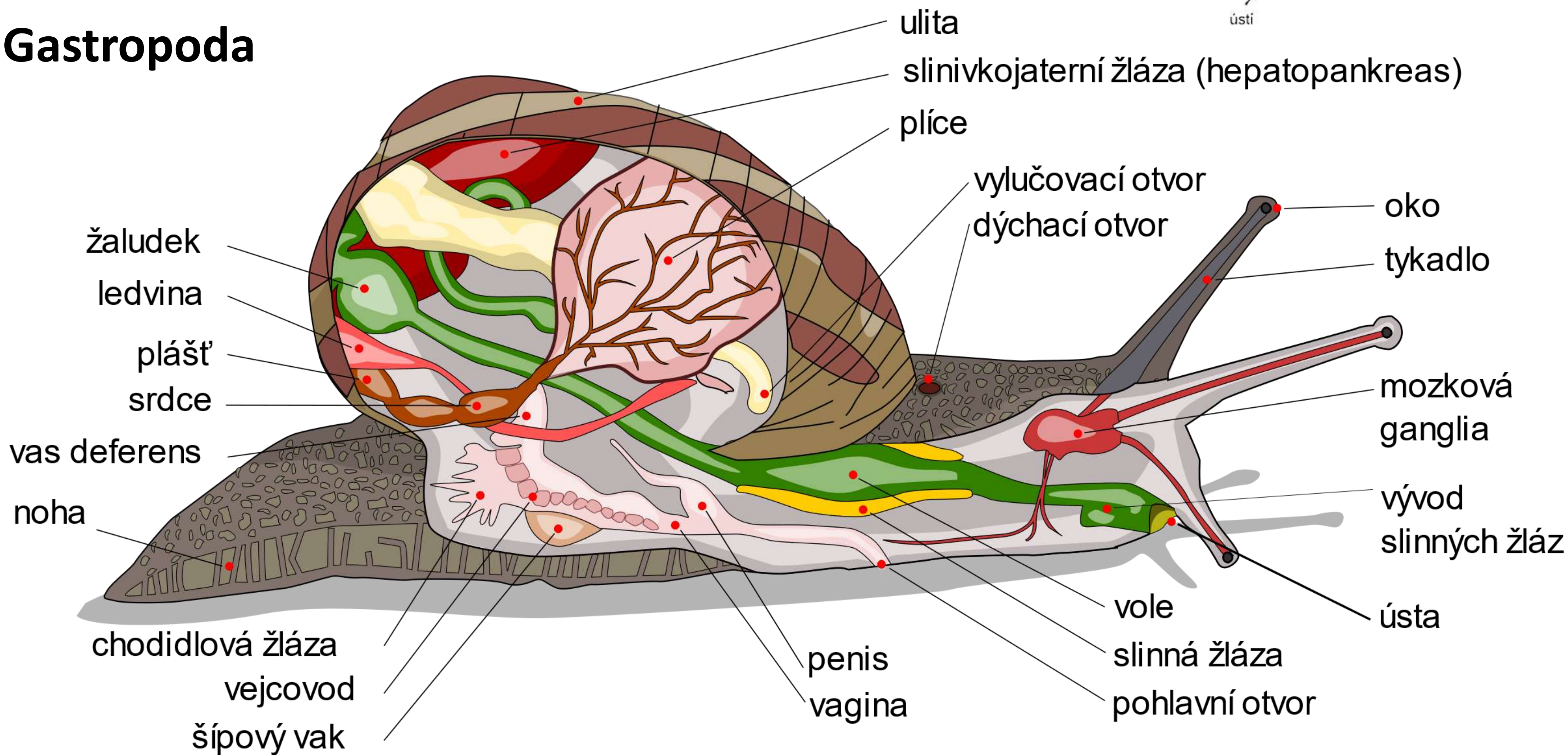
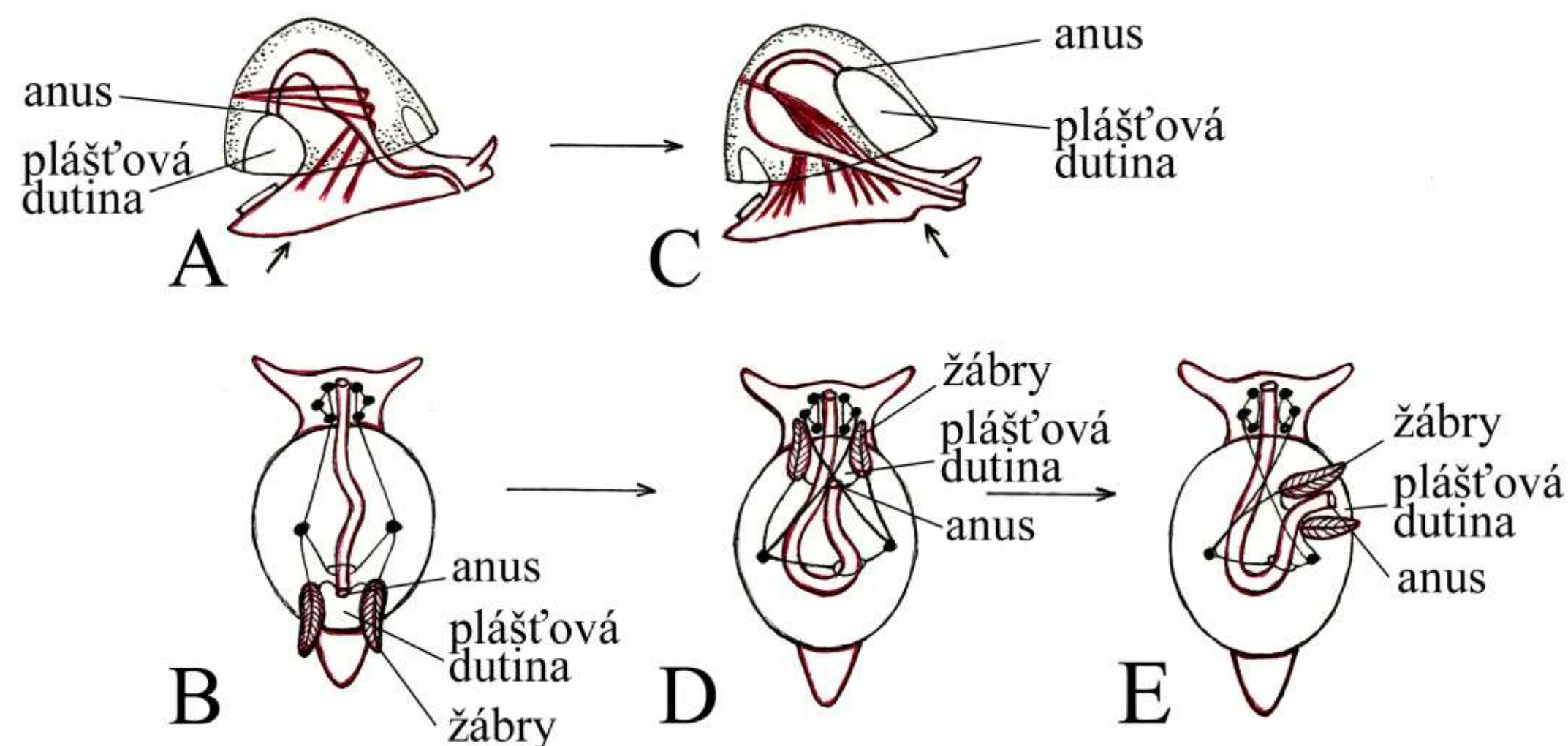


Schéma zakotvení kolumellárního svalu u plžů, a – ulita, b – kolumella, c – vlákna kolumellárního vaku, d – svalnatá noha plže



Torze u plžů. A, B) Stav před torzí. Hlava se zatahuje do ulity až po noze (A). Žábry, plášťová dutina i anus míří dozadu (B). C) Po torzi o 180° se zatahuje nejprve hlava; žábry, plášťová dutina i anus míří dopředu, překřížením nervových drah vzniká chiasma (D). U některých zadožábrych a plicnatých dochází k retorzi; žábry, plášťová dutina i anus pak směřují doprava (E)

Bivalvia



Cerastoderma edule



Pinctada margaritifera



Solen marginatus

Cephalopoda



Nautilus pompilius



Sepia officinalis



Argonauta argo

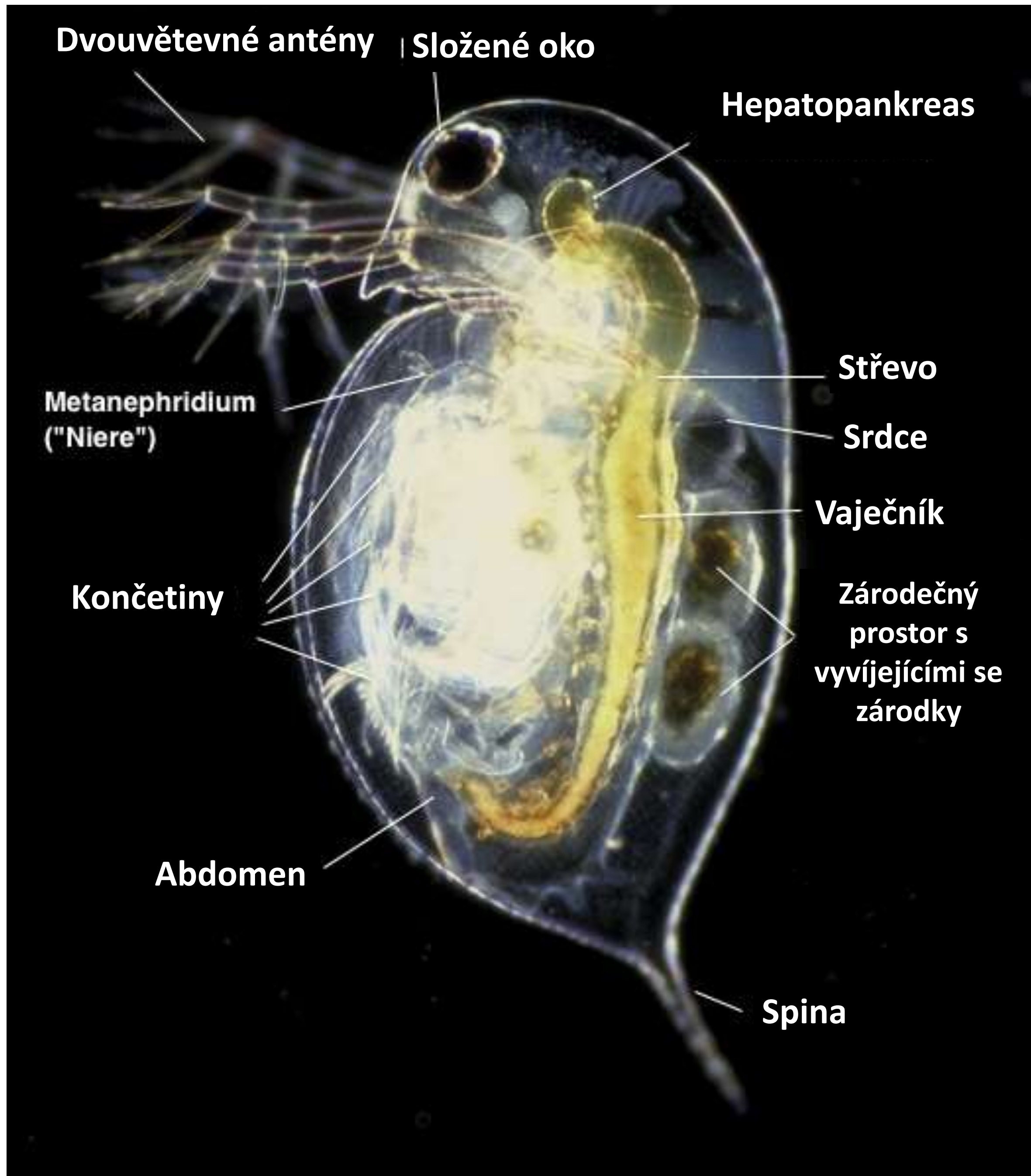
Tato práce byla podpořena projektem: IVA_2018FaF/3140/75



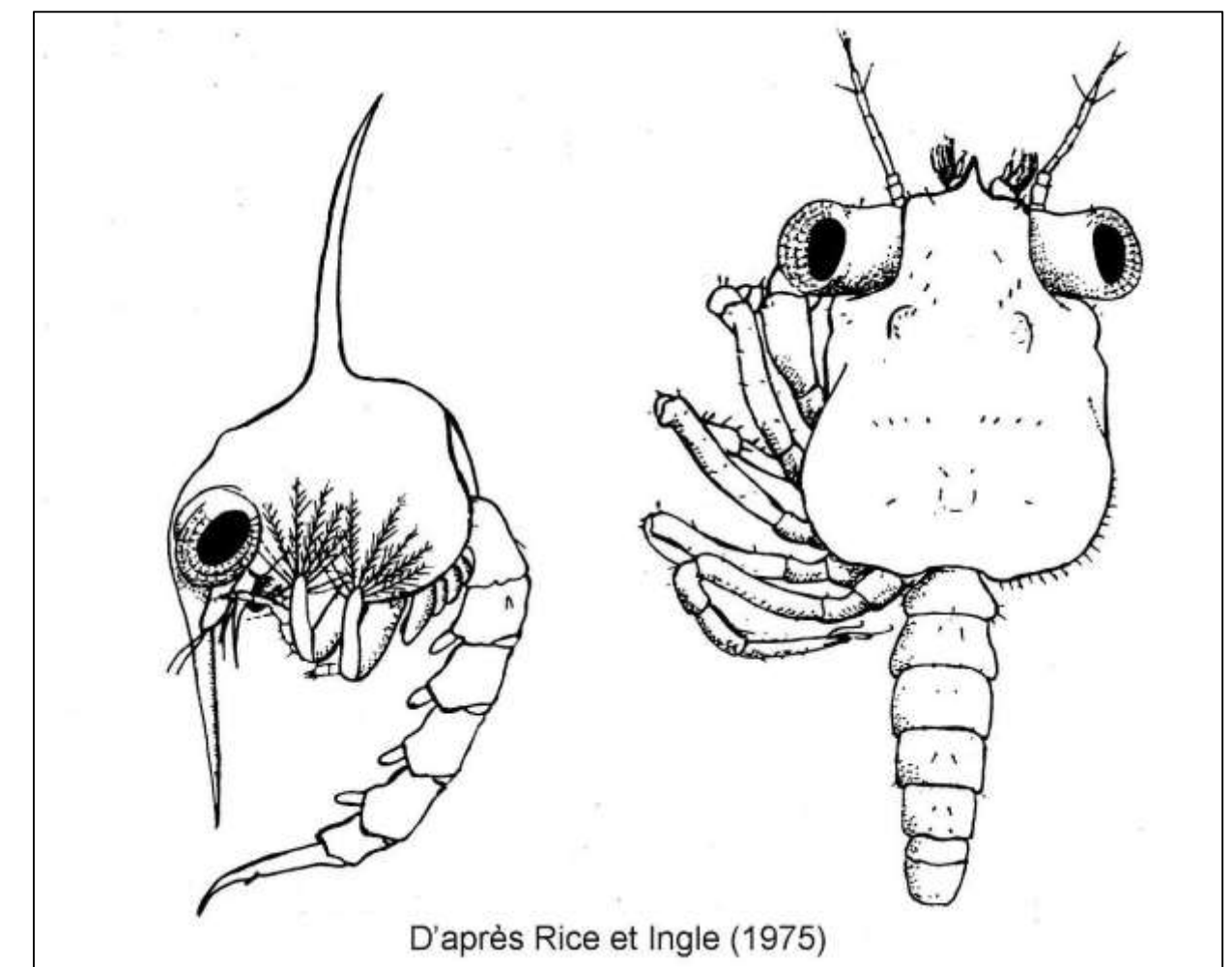
PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Korýši (Crustaceae)

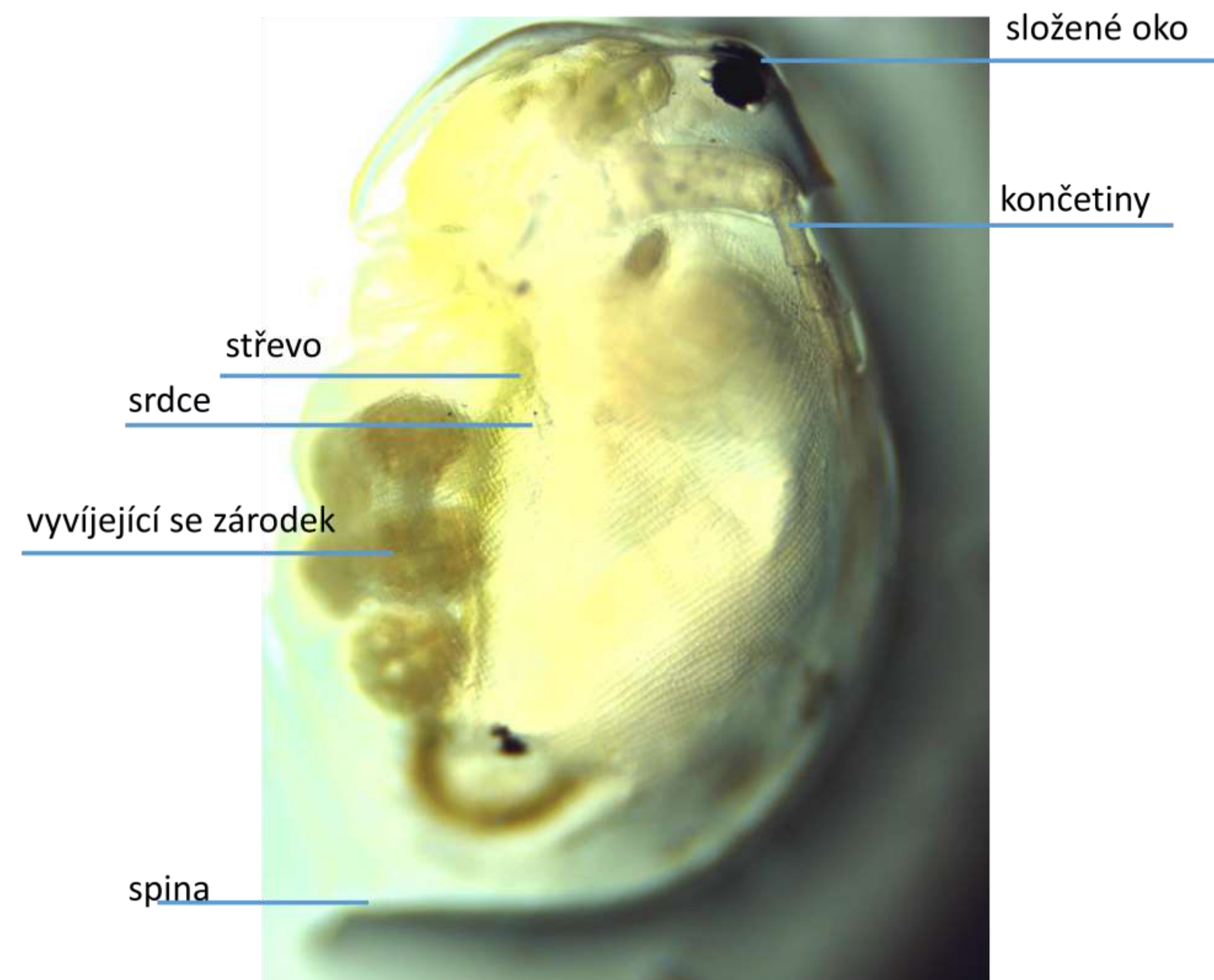
- Žábry
- Rozeklané končetiny
- Krunýř
- Pouze raci-přímý vývoj



Larvy korýšů
nauplius, zoea



Daphnia pulex



Anostraca



Copepoda



Notostraca



Branchiura



Malacostraca



Isopoda



PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Xantoproteinová reakce

Důkaz spočívá v **nitraci aromatického jádra** příslušných aromatických aminokyselin v bílkovině (tryptofan, tyrozin a fenylalanin). Působením kyseliny dusičné nastává nitrace aromatického jádra za vzniku **žlutých nitrosloučenin**. Roztok bílkoviny zahřejeme ve zkumavce s konc. kyselinou dusičnou. Vločky vysrážené bílkoviny mají charakteristické žluté zbarvení. Odlijeme kyselinu a vločky zahřejeme s **přebytkem hydroxidu sodného nebo koncentrovaného roztoku amoniaku**, žlutá barva se změní na **oranžovou až červenou**.

Pomůcky

2 zkumavky, mikropipety, kahan, držák na zkumavky

Chemikálie

Roztok vaječného bílku, koncentrovaná kyselina dusičná HNO_3 , koncentrovaný amoniak NH_4OH

Postup

1. Do zkumavky odměřte pipetou asi 2 ml roztoku vaječného bílku (nebo např. 10% roztok albuminu), přidejte asi 1 ml koncentrované kyseliny dusičné a mírně zahřejte.
2. Bílkovina se srazí ve žluté klky.
3. Přidejte pipetou pár kapek roztoku amoniaku (pozor! reakce je zpočátku bouřlivá).
4. Důkazem přítomnosti bílkoviny je přechod žluté barvy v oranžovou.



10% roztok albuminu



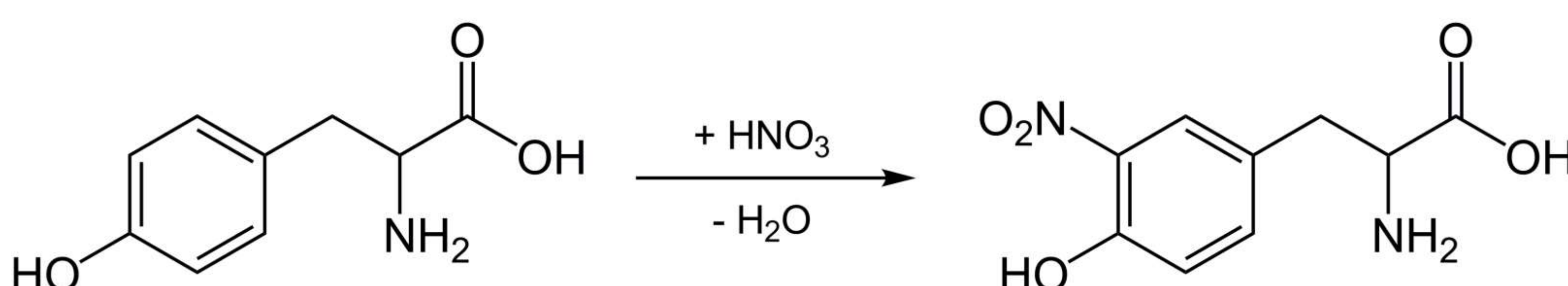
Po přidání kyseliny dusičné



Zahřívání roztoku



Po přidání koncentrovaného roztoku amoniaku

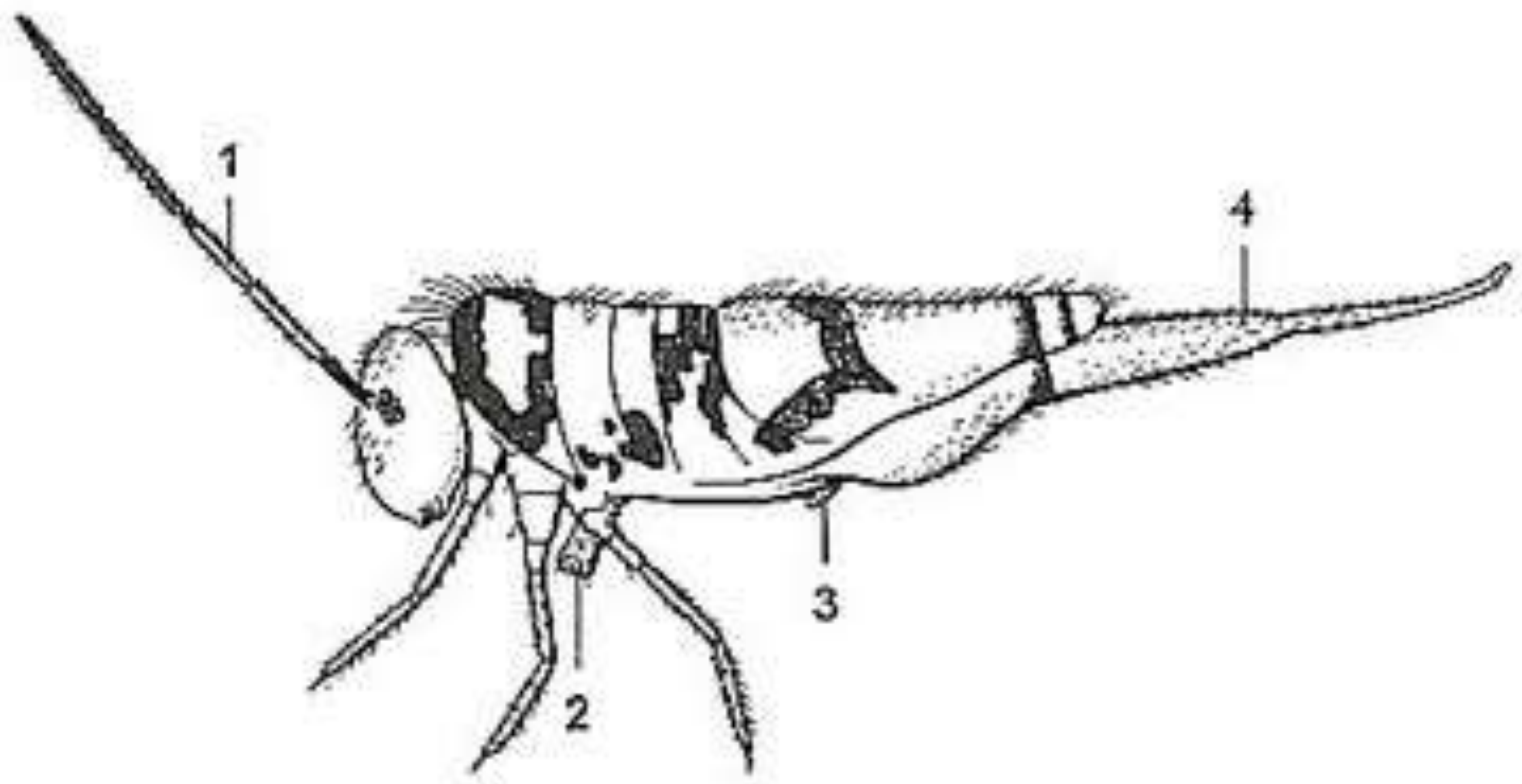


PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Chvostoskoci (*Collembola*)

- Půdní živočichové velikosti několika milimetrů, rozšíření kosmopolitně
- Významný humusotvorný činitel, složka edafonu
- Zadeček má 6 článků
- **Skákací aparát – furcula, retinaculum a ventrální tubus** na zadečku
- **Omatidie**
- Tibiotarsus
- Přímý vývoj

1 - tykadlo, 2, 3, 4 - skákací aparát
(ventrální tubus, retinaculum, furcula)



Folsomia fimetaria



Podura aquatica



Sminthurides aquaticus



Neelus murinus



PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Přístroje v laboratoři

Elisa Reader

Měření absorbance v čase



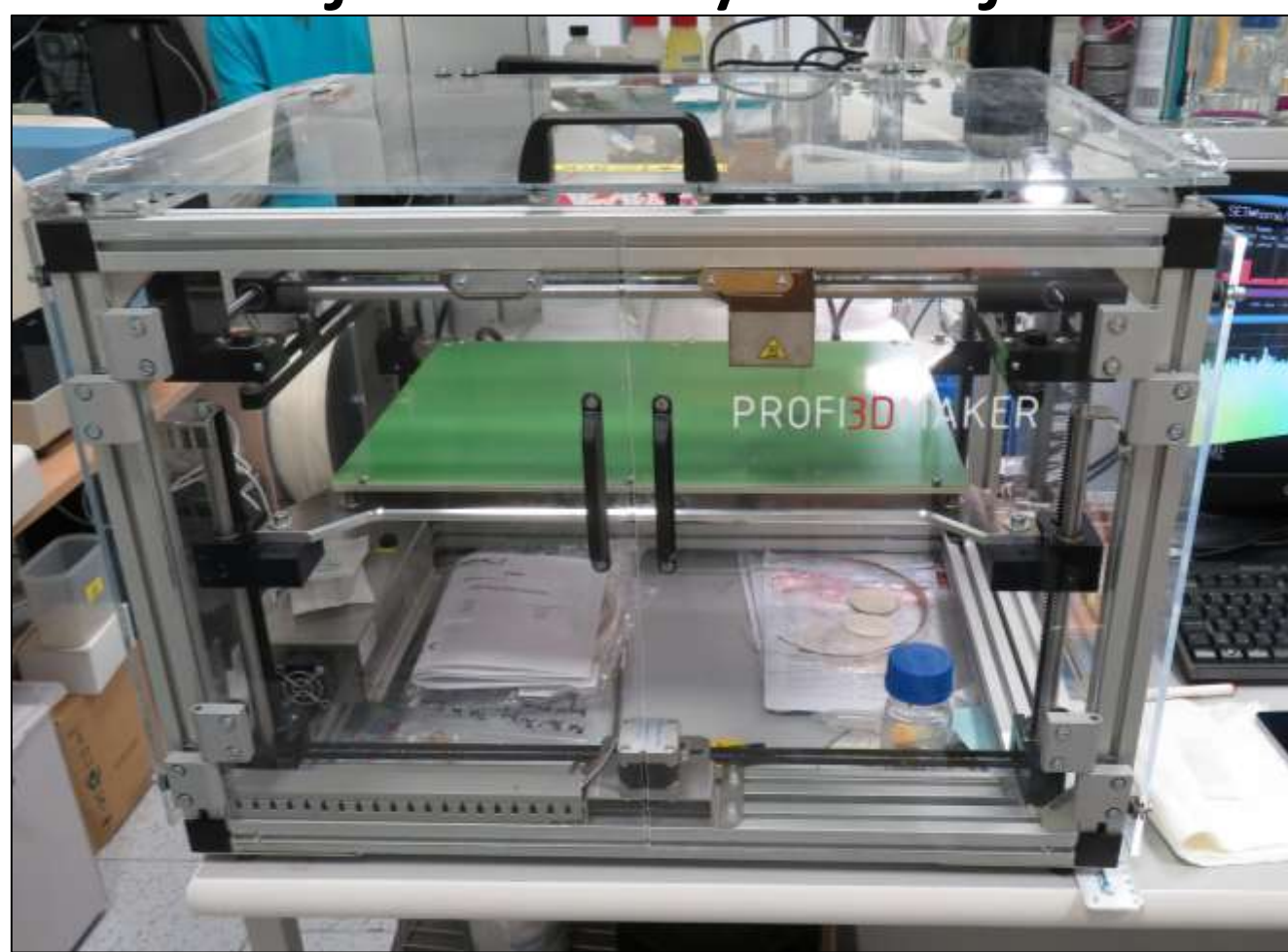
VA STAND 663

Přenosová metoda



3D tiskárna

Tisk trojrozměrných objektů z plastu



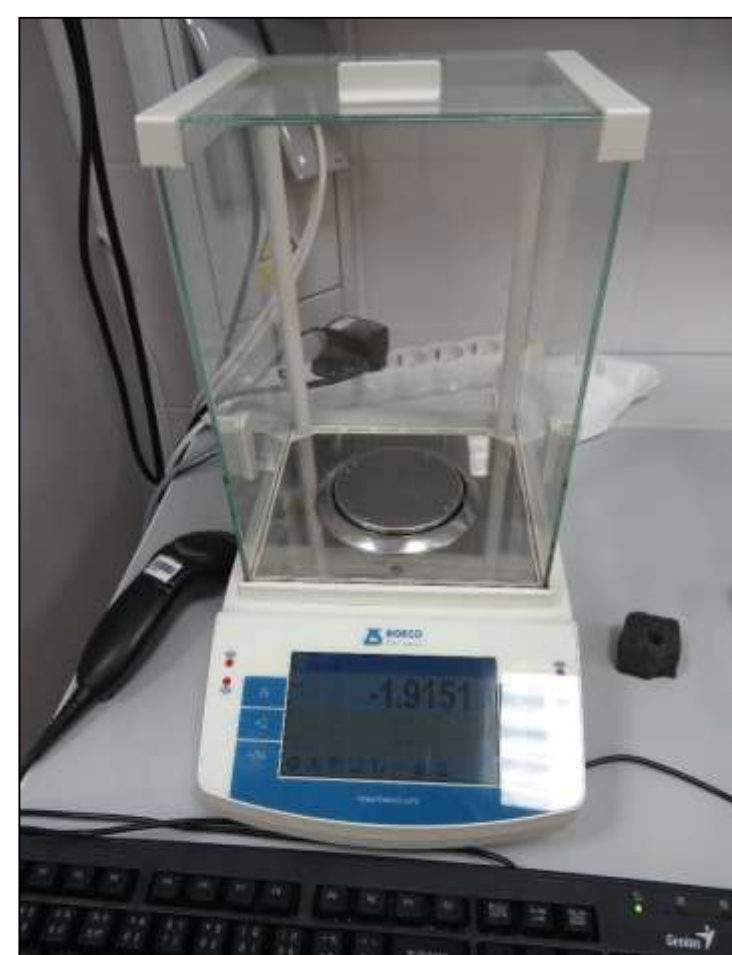
Termoblok

Uchování vzorku při určité teplotě



Analytické váhy

Navažování



VA TRACE ANALYZER

Detekce těžkých kovů



BS - 300



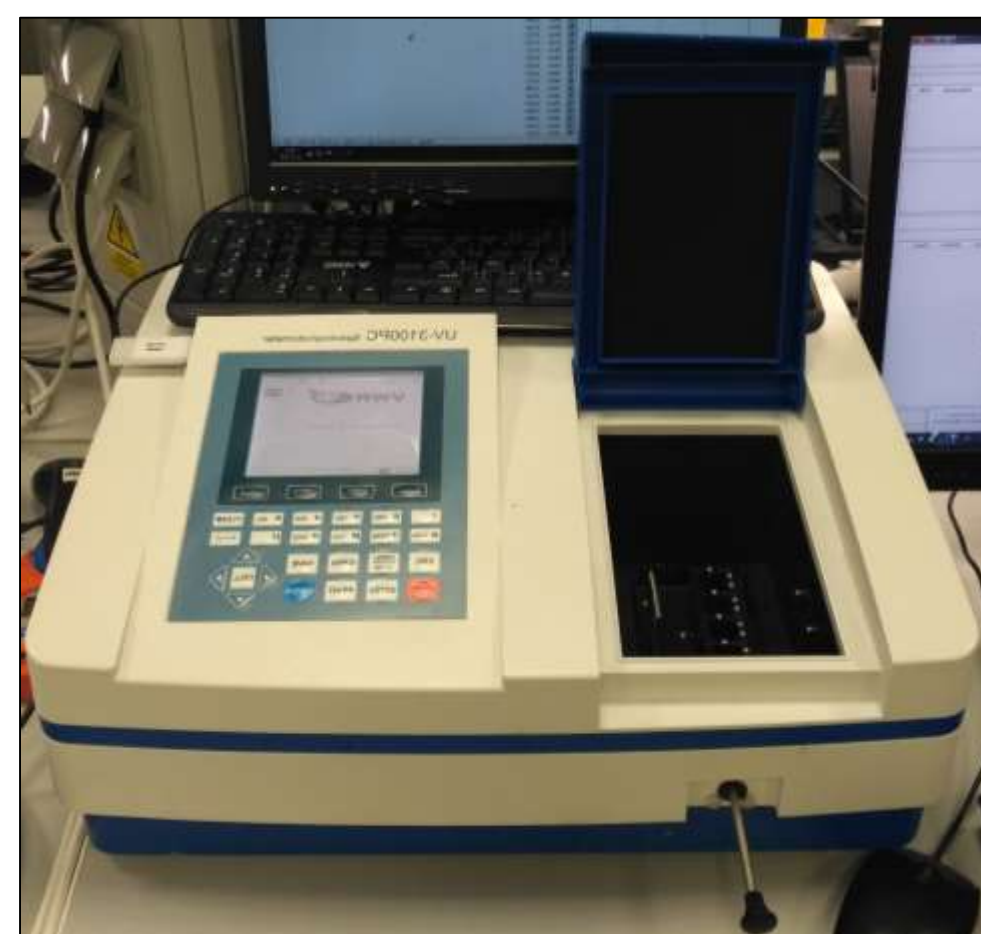
Inkubátor

Růst buněčných linií



Spektrofotometr

Měření absorbance a transmittance



Minicentrifuga

Rychlá separace



HPLC

Analýza vzorku



Centrifuga

Separace na základě hmotnostního gradientu



Linomat

Nanášení vzorku v tenké vrstvě na podklad



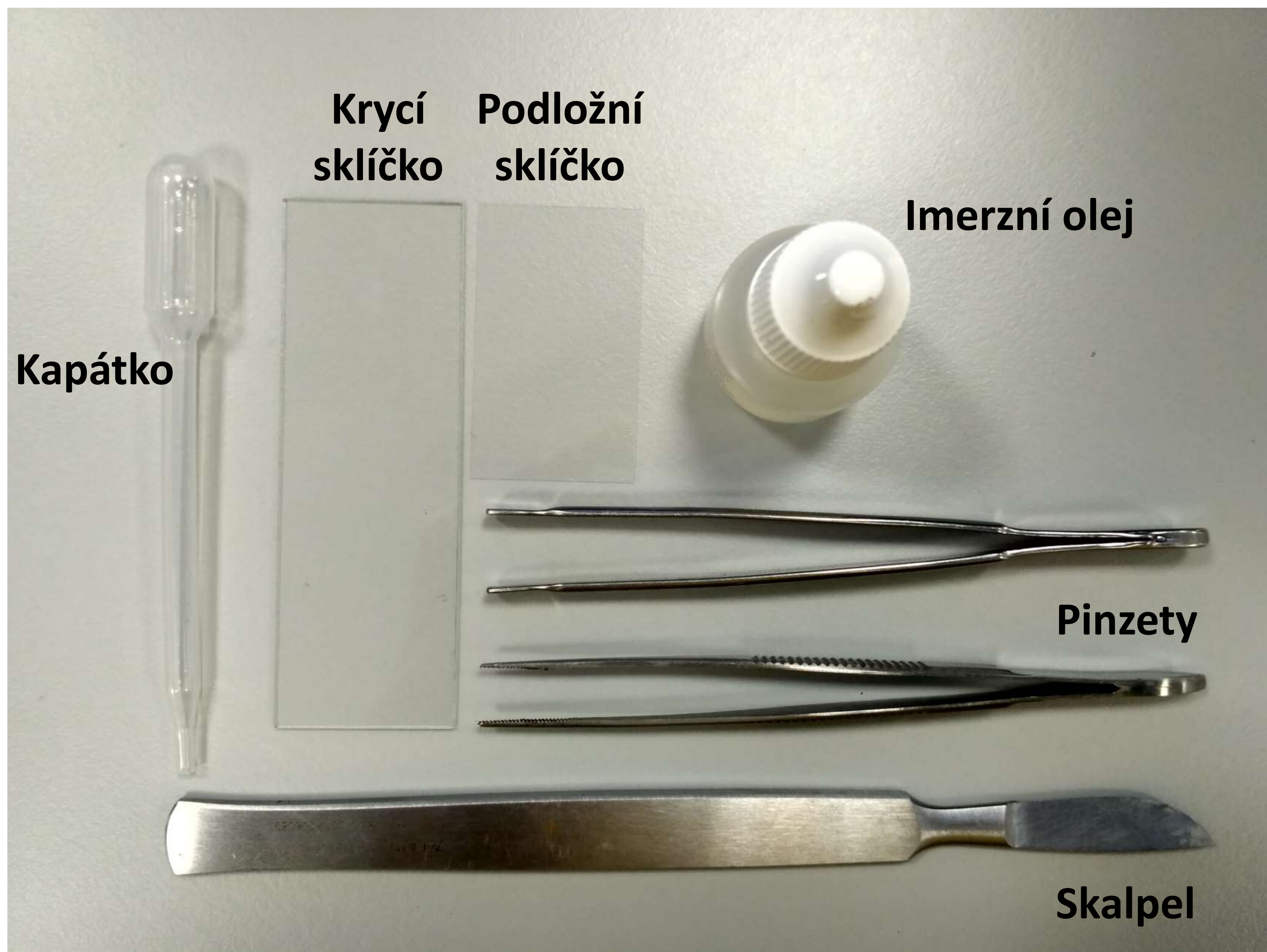
Ultrazvuk

Homogenizace roztoku



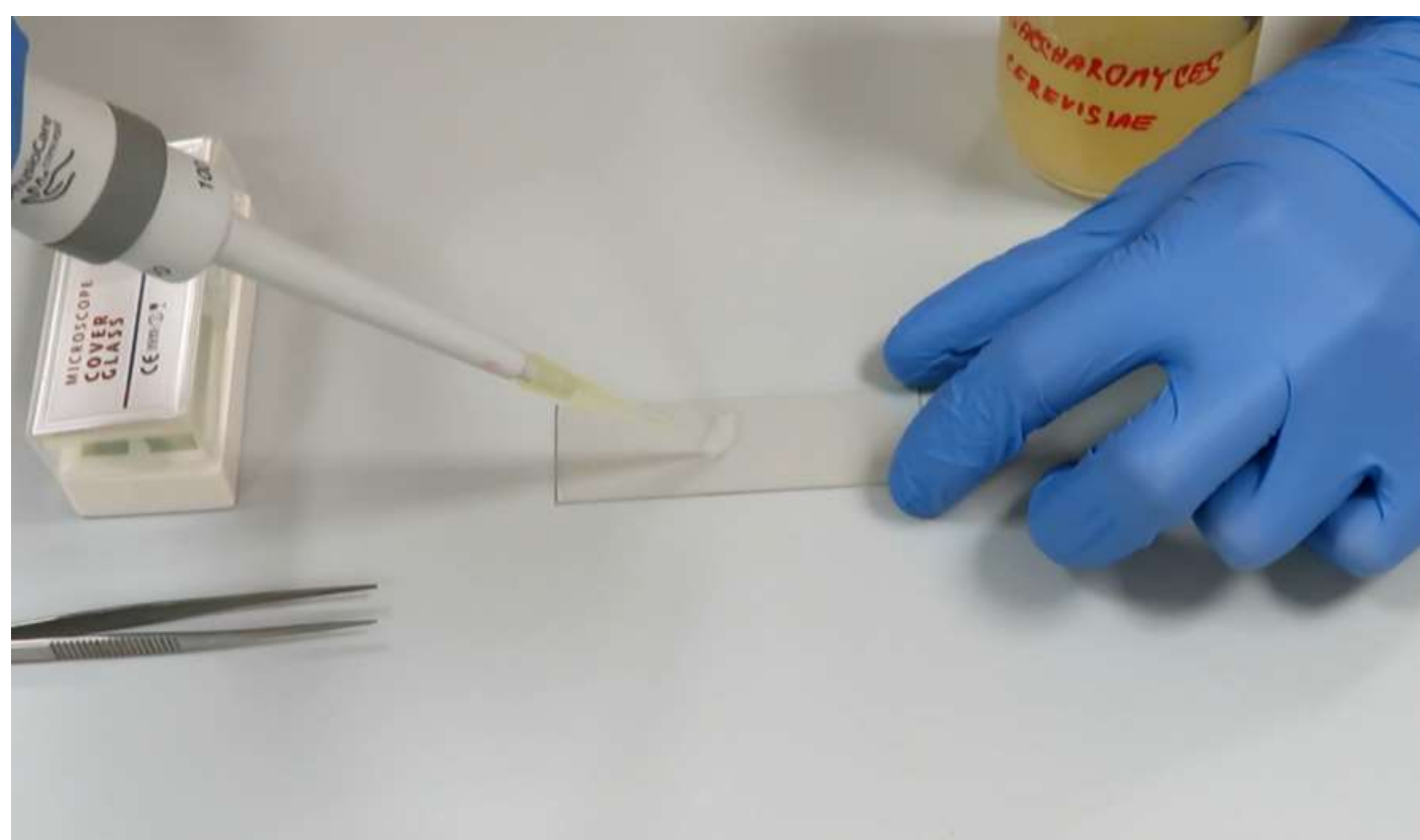
PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Práce s preparátem

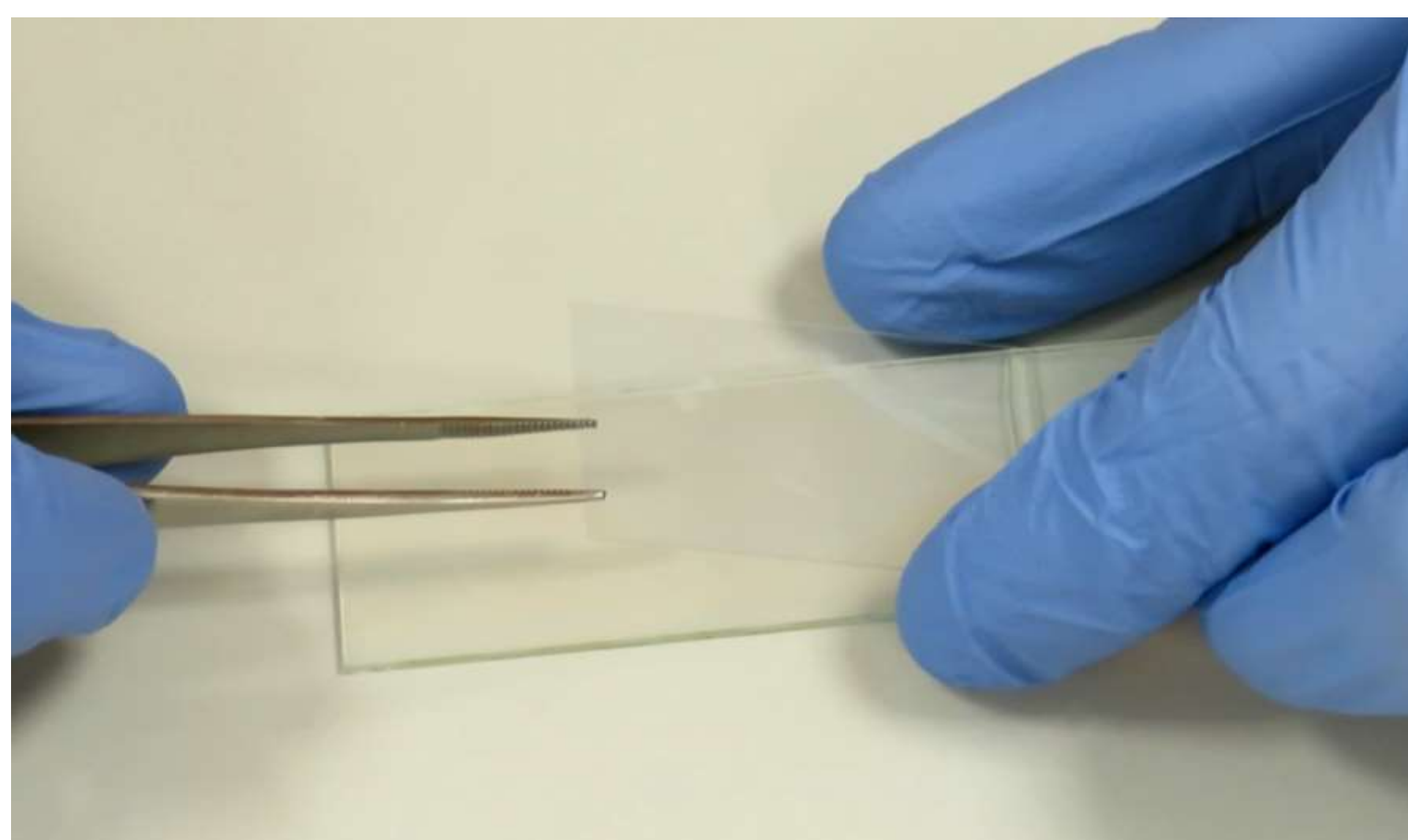


Vodný roztok

Kapalný vzorek přemístíme na podložní sklíčko pomocí automatické pipety nebo kapátka



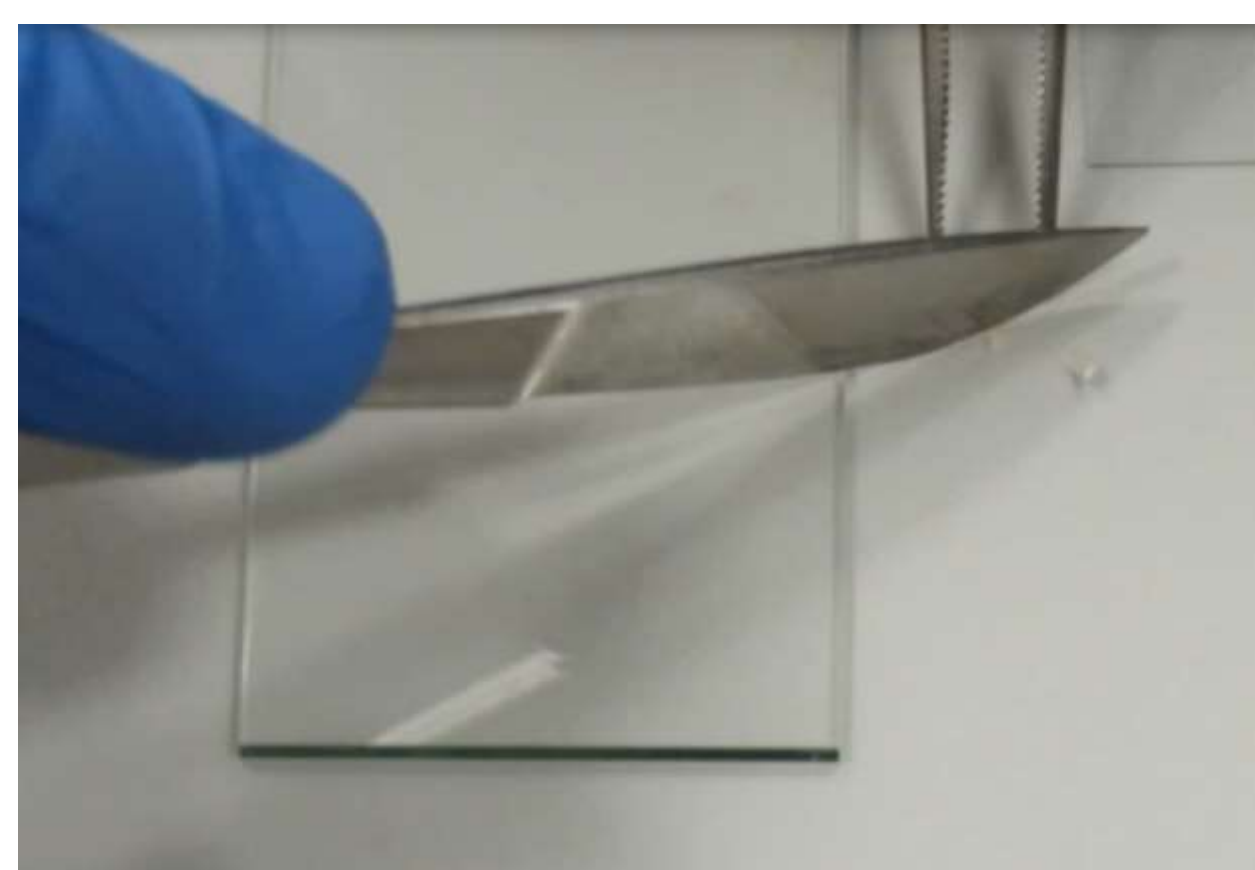
Vzorek pomalým pohybem překrejeme krycím jednorázovým sklíčkem, tak aby ve vzorku nevznikly vzduchové bubliny



Pevný preparát



Pevný vzorek musí být co nejtenčí!

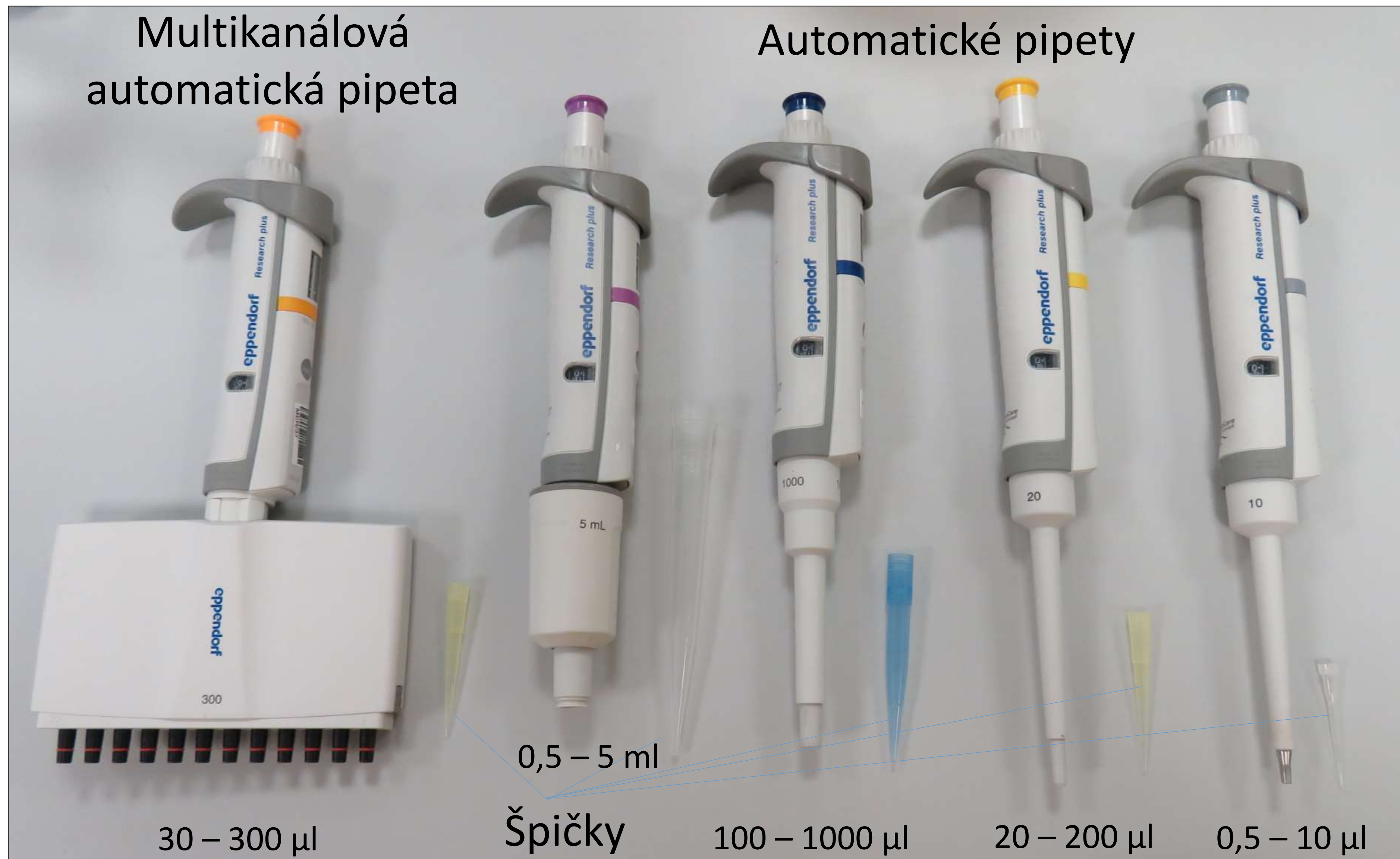


Připravený vzorek pevného preparátu zakápneme vodou a následně opět přikryjeme krycím sklíčkem



PRAKTICKÉ CVIČENÍ

Základy pipetování



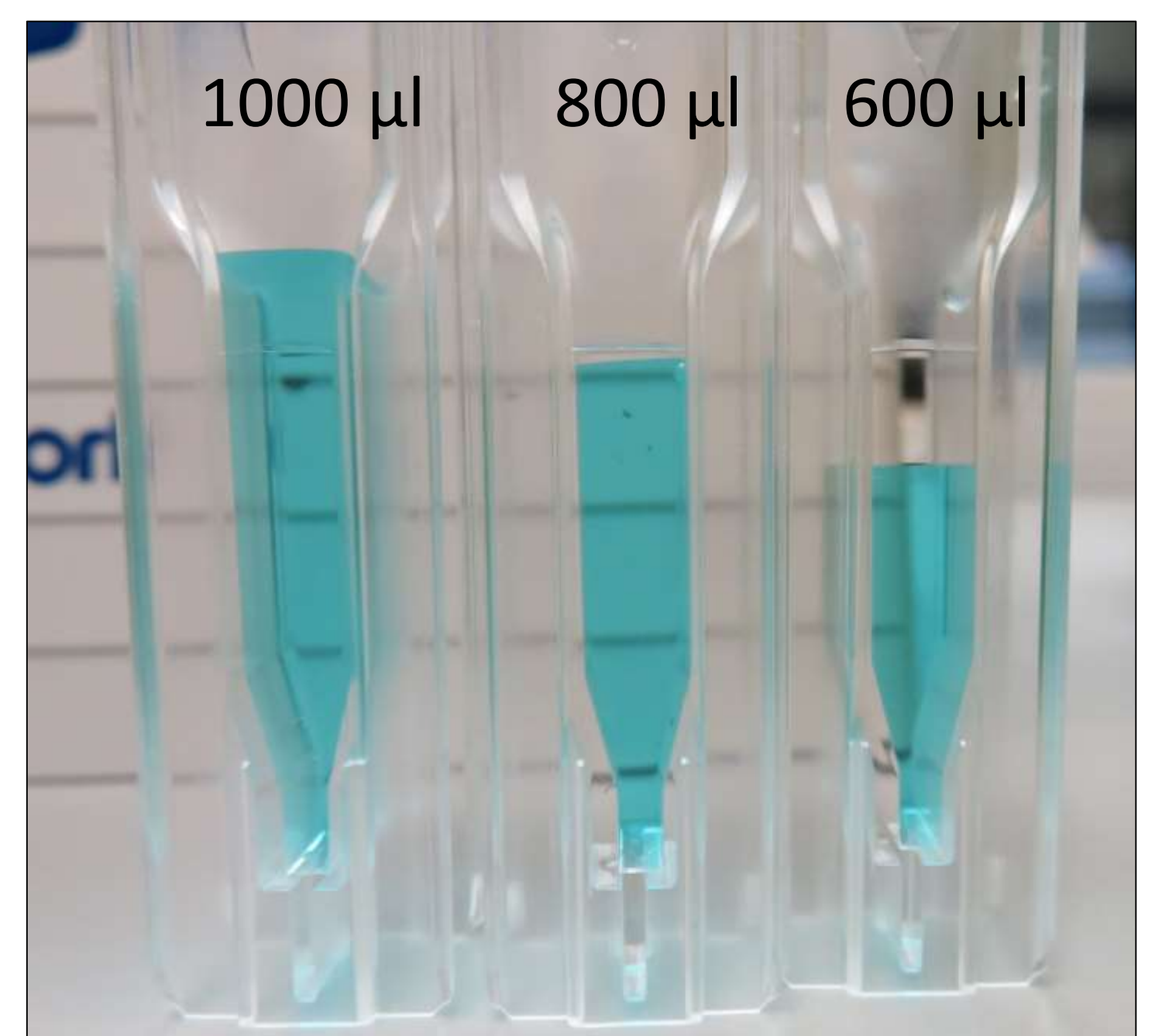
1. poloha



2. poloha



3. poloha



Přímé pipetování

- Nejčastější technika
- Většina vodných roztoků

Reverzní pipetování

- Nasajeme větší objem, než který chceme odměřit
- viskózními nebo vysoce těkavými kapalinami, kapalinami silně smáčivými a s roztoky, které pění
- Většina vodných roztoků

Správné pipetování Chybné pipetování

